



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ
ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

**Ανάλυση και Μαθηματική Προτυποποίηση Σήματος
Ηλεκτροχημικών Μετρήσεων Νευροδιαβιβαστών και των
Μεταβολιτών τους με τη Χρήση Διαφορικής Βολταμμετρίας**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ιάσων Σ. Θεοδωρίδης

Επιβλέπων: Καθ. Δημήτριος Κουτσούρης

ΑΘΗΝΑ 2019



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ
ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

**Ανάλυση και Μαθηματική Προτυποποίηση Σήματος
Ηλεκτροχημικών Μετρήσεων Νευροδιαβιβαστών και των
Μεταβολιτών τους με τη Χρήση Διαφορικής Βολταμμετρίας**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ιάσων Σ. Θεοδωρίδης

Επιβλέπων: Καθ. Δημήτριος Κουτσούρης

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 4/6/2019.

.....
Δημήτριος Κουτσούρης
Καθηγητής ΕΜΠ

.....
Κωνσταντίνα Νικήτα
Καθηγήτρια ΕΜΠ

.....
Γεώργιος Ματσόπουλος
Καθηγητής ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2019

.....

(Υπογραφή)

ΙΑΣΩΝ Σ. ΘΕΟΔΩΡΙΔΗΣ

Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών Ε.Μ.Π.

Copyright © Ιάσων Σ. Θεοδωρίδης, 2019

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Περίληψη

Η βολταμμετρία, αποτέλεσε τη βελτίωση της πολαρογραφικής μεθόδου και έχει αποδειχθεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διερεύνηση των επιπέδων των μονοαμινών. Οι μονοαμίνες είναι απαραίτητα μόρια στη φυσιολογία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Η ανίχνευση και η διερεύνησή τους είναι κρίσιμης σημασίας και, ταυτόχρονα, η ανίχνευσή τους είναι εξαιρετικά δύσκολη. Το κύριο πρόβλημα με την ανίχνευση των μονοαμινών είναι ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής τους είναι πολύ μικρός, ήτοι δεν είναι πολύ εύκολο να ταυτοποιηθούν *ex vivo*. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται μέθοδοι οι οποίες θα μπορούν να μετρήσουν τις μονοαμίνες *in vivo*. Προς αυτή την κατεύθυνση, η βολταμμετρία αποδεικνύεται μια εξαιρετικά χρήσιμη μέθοδος, αφού μπορεί να μετρήσει τα επίπεδα των μονοαμινών *in vivo*.

Στην παρούσα μελέτη αναπτύξαμε μια μεθοδολογία ψηφιοποίησης αναλογικού σήματος βολταμμετρίας και στη συνέχεια για την ανάλυση του σήματος αυτού, χρησιμοποιήσαμε μετασχηματισμούς Fourier με σκοπό να κατανοήσουμε περισσότερο τη φύση των βολταμμετρικών σημάτων. Οι μετρήσεις, που χρησιμοποιήθηκαν αφορούσαν στην *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* ταυτοποίηση μονοαμινών σε παλαιότερες πειραματικές διατάξεις.

Από τη μελέτη μας δείξαμε ότι είναι δυνατή η τροποποίηση του ψηφιοποιημένου σήματος με μετασχηματισμούς Fourier καθώς και ότι οι μετασχηματισμοί απέδωσαν χρήσιμες πληροφορίες για τη φύση τόσο των σημάτων όσο και για τη φύση και συγκέντρωση των μορίων που ταυτοποιήθηκαν.

Η βολταμμετρία είναι μια μεθοδολογία, η οποία αποτελεί ένα εργαλείο αναφοράς για τη μέτρηση βιολογικών μορίων και ειδικότερα σε *in vivo* μοντέλα και ειδικότερα πειραματικές μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο. Η μαθηματική προτυποποίηση του βολταμμετρικού σήματος αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την κατανόηση της μεθόδου και την αύξηση της ικανότητας ειδικότητας και ευαισθησίας της μεθόδου.

Λέξεις κλειδιά: βολταμμετρία, μονοαμίνες, ηλεκτροχημεία, σεροτονίνη, DOPAC, ντοπαμίνη, μετασχηματισμοί Fourier, k-means, μηχανική μάθηση

Abstract

Voltammetry constitutes the evolution of polarography and turned out to be a useful method for the detection of monoamines. Monoamines are crucial molecules in the physiology of the Central Nervous System (CNS). Monoamines detection and inquiry hold a critical significance, although their detection presents extreme difficulty. The main obstacle in the monoamines determination is their small metabolic half-time, meaning that their *ex vivo* identification is not easy. Therefore, it is crucial to identify monoamines *in vivo*. Voltammetry turns out to be a useful method, able to determinate the levels of monoamines *in vivo*.

In the present research, we developed a method for the digitization of analog signals and subsequently we applied *Fourier* Transformation, in order to process the voltammetric signals furtherly and comprehend their properties. The measurements being utilized in this study come from the *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* monoamine identification of older experimental procedures.

During this study, we demonstrated that *Fourier* transformations of the voltammetric signals ascribe useful information for the signals themselves, as long as for the identity and concentration of the molecules being detected.

Voltammetry composes a methodology, which appears to be a reference tool in measurements of biological molecules, especially in *in vivo* and real-time models. Mathematical standardization of the voltammetric signal constitutes an important method towards the understanding of the method, as long as the amelioration of sensitivity and selectivity.

Keywords: voltammetry, monoamines, electrochemistry, serotonin, DOPAC, dopamine, Fourier transformation, k-means, machine learning

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το μέλος ΕΔΙΠ της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Γεώργιο Λάμπρου, που με δέχτηκε στο Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο της Α' Παιδιατρικής Κλινικής του ΕΚΠΑ, για την καθοδήγηση, τη βοήθεια, τη διαρκή επίβλεψη και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ αποδίδεται και στο μεταδιδακτορικό ερευνητή Πέτρο Τουμπανιάρη για την πολύτιμη βοήθεια, συνεργασία και φιλική του διάθεση. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Κουτσούρη.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου, Στέλιο και Ιωάννα, και τον αδερφό μου, Αλέξη, καθώς και τους μοναδικούς μου φίλους που στάθηκαν δίπλα μου έτοιμοι να με γεμίσουν στήριξη, υπομονή και αισιοδοξία.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract	6
Ευχαριστίες	7
Περιεχόμενα	8
Πίνακας Εικόνων	11
Κατάλογος Πινάκων	17
Κατάλογος Εξισώσεων	18
Κατάλογος Χημικών Αντιδράσεων	21
ΜΕΡΟΣ Ι.....	22
<i>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</i>	22
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1-ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	23
1.1. Ο Νευρώνας	24
1.1.1 Νευρογλοιακά κύτταρα.....	27
1.2. Η Κυτταρική Μembrάνη	27
1.2.1. Χαρακτηριστικά των Διαύλων Ιόντων.....	29
1.2.2. Δυναμικό Ηρεμίας της Μembrάνης	30
1.3. Κυτταρική επικοινωνία.....	32
1.3.1. Συναπτικά δυναμικά	33
1.3.2. Δυναμικά ενέργειας	35
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2-ΟΙ ΜΟΝΟΑΜΙΝΕΣ	40
2.1. Εισαγωγή στις Ηλεκτροχημικά Ενεργές Μονοαμίνες	40
2.2. Άλλοι Νευροδιαβιβαστές.....	43
2.2.1. Ακετυλοχολίνη	43
2.2.2. Λοιπά Αμινοξέα.....	44
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3-ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ	45
3.1. Στοιχεία Ηλεκτροχημείας.....	46
3.1.1. Οξείδωση.....	48
3.1.2. Ηλεκτροκατάλυση	48
3.1.3. Οξειδωτικές Ενώσεις	48
3.2. Βολταμμετρία	49
3.2.1. Βολταμμετρικές Τεχνικές.....	52
3.2.1.1. Αμπερομετρία	52
3.2.1.2. Κυκλική Βολταμμετρία.....	52

3.2.1.3.	<i>Fast Scan Cyclic Voltammetry (FSCV)</i>	53
3.2.1.4.	<i>Differential Pulse Voltammetry (DPV)</i>	53
3.2.2.	Ζητήματα Ευαισθησίας και Ειδικότητας των Ηλεκτροδίων	55
3.2.2.1.	<i>Τροποποιήσεις στην Επιφάνεια του Ηλεκτροδίου</i>	55
3.2.2.2.	<i>Επιδράσεις του Ρυθμού Σάρωσης</i>	57
3.2.2.3.	<i>Επιδράσεις του pH</i>	58
3.3.	Άλλες Αναλυτικές Τεχνικές	58
ΣΚΟΠΟΣ		60
ΜΕΡΟΣ II		61
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ		61
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4-ΥΛΙΚΟ		62
4.1.	Χημικά και Διαλύματα	62
4.2.	Ηλεκτρόδια	62
4.3.	Επίμυες και Νευροχειρουργική Επέμβαση	63
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5-ΜΕΘΟΔΟΣ		65
5.1.	Ανάκτηση Δεδομένων	65
5.2.	Recording Sessions	65
5.3.	Ψηφιοποίηση Δεδομένων	65
5.4.	Ανάλυση Δεδομένων	68
5.4.1.	Μετασχηματισμός Fourier.....	68
5.4.1.1.	<i>Μετασχηματισμός Fourier Διακριτού Χρόνου (DTFT)</i>	69
5.4.1.2.	<i>Διακριτός Μετασχηματισμός Fourier (DFT)</i>	72
5.4.2.	Ταξινόμηση των Δεδομένων με k-means.....	75
5.4.2.1.	<i>Ο Αλγόριθμος k-means (ή c-means, ή IsoData)</i>	79
5.4.3.	Λογισμικό Ανάλυσης Δεδομένων.....	83
ΜΕΡΟΣ III		84
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		84
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6-Η ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ IN VITRO ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ . 85		
6.1.	<i>In Vitro</i> Μέτρηση Σεροτονίνης με Ηλεκτρόδιο Άνθρακα Πολλαπλών Ινών (Multi-Fiber Electrode)	85
6.2.	<i>In Vitro</i> Μέτρηση Σεροτονίνης με Ηλεκτρόδιο Άνθρακα Μίας Ίνας (Single-Fiber Electrode)	85
6.3.	<i>In Vitro</i> Μέτρηση Σεροτονίνης με Ηλεκτρόδιο Γραφίτη (Graphite Electrode) 85	
7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7-Η ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ IN VITRO ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT ΚΑΙ DOPAC		95

7.1.	<i>In Vitro</i> Μέτρηση των 5-ΗΙΑΑ, 5-ΗΤΡ και 5-ΗΤ με Ηλεκτρόδιο Άνθρακα Πολλαπλών Ινών (Multi-Fiber Electrode).....	95
7.2.	<i>In Vitro</i> Μέτρηση 5-ΗΙΑΑ, DOPAC και 5-ΗΤ με Ηλεκτρόδιο Γραφίτη (Graphite Electrode)	95
8.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8-Η ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ <i>EX VIVO</i> ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ.....	102
8.1.	<i>Ex Vivo</i> Μέτρηση με Ηλεκτρόδιο Άνθρακα Πολλαπλών Ινών (Multi-Fiber Electrode) σε Δείγμα Πλάσματος Αίματος.....	102
8.2.	<i>Ex Vivo</i> Μέτρηση με Ηλεκτρόδιο Γραφίτη (Graphite Electrode) σε Δείγμα Πλήρους Αίματος.....	102
9.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9-Η ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ <i>IN VIVO</i> ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ.....	109
9.1.	<i>In Vivo</i> Μέτρηση με Ηλεκτρόδιο Άνθρακα Μονής Ίνας (Single-Fiber Electrode) σε Εγκέφαλο Επίμυων.....	109
9.2.	<i>In Vivo</i> Μέτρηση με Ηλεκτρόδιο Γραφίτη (Graphite Electrode) σε Εγκέφαλο Επίμυων.....	109
10	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 - ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑΤΑ FOURIER ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΣΗΜΑΤΩΝ	116
	ΜΕΡΟΣ IV	119
	<i>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</i>	119
11	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11-ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	120
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	124
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	129
12	ΚΩΔΙΚΑΣ MATLAB.....	130
12.1.	Μετασχηματισμοί Fourier	130
12.1.1.	Υλοποίηση γραφικών παραστάσεων και κλήση συναρτήσεων για τους <i>M/Σ Fourier</i>	131
12.1.2.	Μετασχηματισμός <i>DTFT</i>	132
12.1.3.	Μετασχηματισμός <i>DFT</i>	132
12.2.	<i>K-Means</i> των Μετασχηματισμών Fourier.....	133

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1. Διάγραμμα του ΚΝΣ (2), που απλοποιείται σε δύο μέρη: εγκέφαλος (1) και νωτιαίος μυελός (3).....	23
Εικόνα 2. Οι λοβοί του εγκεφαλικού φλοιού.	24
Εικόνα 3. Ο νευρώνας.	25
Εικόνα 4. Απεικόνιση του νευρικού άξονα ενός περιφερειακού νευρώνα, όπου φαίνονται οι κόμβοι <i>Ranvier</i>	25
Εικόνα 5. Τα είδη των νευρικών κυττάρων ανάλογα με τον αριθμό των αποφυάδων τους. Μονόπολα (1), δίπολα (2), πολύπολα (3), και ψευδομονόπολα (4).	26
Εικόνα 6. Η κυτταρική μεμβράνη ως διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων, με τις υδρόφιλες κεφαλές εκατέρωθεν προς τα έξω και τις υδρόφοβες ουρές στο εσωτερικό.	28
Εικόνα 7. Λεπτομερής εικόνα της κυτταρικής μεμβράνης, όπου φαίνονται τα φωσφολιπίδια (1), χοληστερόλη, γλυκολιπίδια και σάκχαρα (2, 3, και 4, αντίστοιχα), ενώ στους αριθμούς 5, 6, 7 και 8 φαίνονται οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως διάυλοι ιόντων.	29
Εικόνα 8. Γραφική παράσταση του δυναμικού της μεμβράνης συναρτήσει του χρόνου t . Φαίνεται το δυναμικό ηρεμίας, στα -70mV , η εκπόλωση (depolarization), η υπερπόλωση (hyperpolarization) και η επαναπόλωση (repolarization) της μεμβράνης.	33
Εικόνα 9. Οι απολήξεις του νευράξονα του προσυναπτικού κυττάρου καταλήγουν στο κυρίως σώμα ή στους δενδρίτες του μετασυναπτικού κυττάρου. Εκεί προκαλούν δύο ειδών δυναμικά, διεγερτικά (EPSP) ή ανασταλτικά (IPSP).	34
Εικόνα 10. Το κατώφλι δυναμικού τοποθετείται στα -40mV . Φαίνεται ένα διεγερτικό μετασυναπτικό δυναμικό (EPSP, πράσινη γραμμή), ένα ανασταλτικό μετασυναπτικό δυναμικό (IPSP, κόκκινη γραμμή), και τέλος η άθροισή τους (πορτοκαλί διακεκομμένη γραμμή), που δεν ξεπερνάει τον ουδό δυναμικού και άρα δεν δημιουργεί δυναμικό ενέργειας.	35
Εικόνα 11. Δυναμικό ενέργειας.	36
Εικόνα 12. Απεικόνιση του προσυναπτικού και του μετασυναπτικού κυττάρου που συμμετέχουν στη νευροδιαβίβαση.....	37
Εικόνα 13. Αναπαράσταση μιας ηλεκτρικής σύναψης.	38
Εικόνα 14. Αναπαράσταση της νευροδιαβίβασης σε μια χημική σύναψη.....	39
Εικόνα 15. Βιοσύνθεση των μονοαμινών ντοπαμίνη και αδρεναλίνη.	41
Εικόνα 16. Χημική δομή της ακετυλοχολίνης.....	43
Εικόνα 17. Ο πολαρογράφος του Heyrovský.	45
Εικόνα 18. Σύστημα τριών ηλεκτροδίων στη βολταμετρία. (1) Ηλεκτρόδιο εργασίας, (2) βοηθητικό ηλεκτρόδιο, (3) ηλεκτρόδιο αναφοράς.	50

Εικόνα 19. Hanging Mercury Drop Electrode.....	51
Εικόνα 20. Μοντέλο του βολταμμετρικού ηλεκτροδίου και η αντίστοιχη οξειδοαναγωγική αντίδραση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου άνθρακα (από: <i>Theodoridis & Lambrou</i> (2019)) (31).....	51
Εικόνα 21. Το δυναμικό εισόδου στην κυκλική βολταμμετρία αυξάνει σαν ράμπα γραμμικά σε κυκλικές φάσεις.....	53
Εικόνα 22. Κυκλική βολταμμετρία.....	53
Εικόνα 23. Αλλαγή της τάσεως εισόδου στην Διαφορική Βολταμμετρία (από <i>Theodoridis & Lambrou</i> (2019)) (31).	54
Εικόνα 24. Model 900 Small Animal Stereotaxic Instrument.....	64
Εικόνα 25. Σκίτσο αναπαράστασης, επίμυος σε στερεοτακτικό μηχανισμό.....	64
Εικόνα 26. Φωτογραφία μιας μέτρησης (μπλε γραφίδα).	67
Εικόνα 27. Η μέτρηση με την προσθήκη διάφανου millimeter.....	67
Εικόνα 28. Αναπαράσταση με Excel της παραπάνω μέτρησης μετά την ψηφιοποίηση.....	68
Εικόνα 29. Γραφική παράσταση της συνάρτησης διακριτού χρόνου $x[n]=0.6^n$, για $0 \leq n \leq 9$. .	71
Εικόνα 30. Γραφική παράσταση του μέτρου $ X(e^{j\omega}) $ του DTFT της συνάρτησης $x[n]=0.6^n$ της προηγούμενης εικόνας. Διακρίνεται ότι το μέτρο του DTFT είναι συνεχής συνάρτηση και περιοδική ως προς ω	71
Εικόνα 31. Γραφική παράσταση της γωνίας $\angle X(e^{j\omega})$ του DTFT της συνάρτησης $x[n]=0.6^n$. Φαίνεται ότι η γωνία του DTFT είναι περιττή συνάρτηση του ω	72
Εικόνα 32. Γραφική παράσταση του μέτρου $ X[k] $ του DFT της συνάρτησης $x[n]=0.6^n$. Διακρίνεται ότι το μέτρο του DFT είναι διακριτή συνάρτηση, σε αντίθεση με τον DTFT.....	74
Εικόνα 33. Γραφική παράσταση της γωνίας $\angle X[k]$ του DFT της συνάρτησης $x[n]=0.6^n$	74
Εικόνα 34. Συμπαγείς συστάδες (A), επιμήκεις συστάδες (B), σφαιρικές και ελλειψοειδείς συστάδες (C).	77
Εικόνα 35. Υποκειμενικότητα συσταδοποίησης. Ένας αλγόριθμος ανακαλύπτει 2 συστάδες (διακεκομμένη γραμμή), ενώ ένας άλλος ανακαλύπτει 4 (συνεχής γραμμή).	78
Εικόνα 36. Αναπαράσταση με Excel της μέτρησης σεροτονίνης, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.	86
Εικόνα 37. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της μέτρησης σεροτονίνης, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.....	86
Εικόνα 38. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>in vitro</i> μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.	87

Εικόνα 39. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>in vitro</i> μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.	87
Εικόνα 40. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>in vitro</i> μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.	88
Εικόνα 41. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>in vitro</i> μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.	88
Εικόνα 42. Αναπαράσταση με Excel της μέτρησης σεροτονίνης, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.	89
Εικόνα 43. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της μέτρησης σεροτονίνης, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα..	89
Εικόνα 44. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>in vitro</i> μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.	90
Εικόνα 45. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>in vitro</i> μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.	90
Εικόνα 46. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>in vitro</i> μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.	91
Εικόνα 47. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>in vitro</i> μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.	91
Εικόνα 48. Αναπαράσταση με Excel της μέτρησης σεροτονίνης, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.....	92
Εικόνα 49. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της μέτρησης σεροτονίνης, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.	92
Εικόνα 50. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>in vitro</i> μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο γραφίτη.....	93
Εικόνα 51. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>in vitro</i> μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο γραφίτη.....	93
Εικόνα 52. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>in vitro</i> μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο γραφίτη.....	94
Εικόνα 53. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>in vitro</i> μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο γραφίτη.....	94
Εικόνα 54. Αναπαράσταση με Excel της μέτρησης 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.	96
Εικόνα 55. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της μέτρησης 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.	96

Εικόνα 56. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>in vitro</i> μέτρησης 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.....	97
Εικόνα 57. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>in vitro</i> μέτρησης 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.....	97
Εικόνα 58. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>in vitro</i> μέτρησης 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.....	98
Εικόνα 59. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>in vitro</i> μέτρησης 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.....	98
Εικόνα 60. Αναπαράσταση με Excel της μέτρησης 5-HIAA, DOPAC, 5-HT, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.....	99
Εικόνα 61. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της μέτρησης 5-HIAA, DOPAC, 5-HT, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.....	99
Εικόνα 62. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>in vitro</i> μέτρησης 5-HIAA, DOPAC, 5-HT με ηλεκτρόδιο γραφίτη.....	100
Εικόνα 63. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>in vitro</i> μέτρησης 5-HIAA, DOPAC, 5-HT με ηλεκτρόδιο γραφίτη.....	100
Εικόνα 64. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>in vitro</i> μέτρησης 5-HIAA, DOPAC, 5-HT με ηλεκτρόδιο γραφίτη.....	101
Εικόνα 65. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>in vitro</i> μέτρησης 5-HIAA, DOPAC, 5-HT με ηλεκτρόδιο γραφίτη.....	101
Εικόνα 66. Αναπαράσταση με Excel της <i>ex vivo</i> μέτρησης πλάσματος αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.....	103
Εικόνα 67. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της <i>ex vivo</i> μέτρησης πλάσματος αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.....	103
Εικόνα 68. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>ex vivo</i> μέτρησης πλάσματος αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.....	104
Εικόνα 69. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>ex vivo</i> μέτρησης πλάσματος αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.....	104
Εικόνα 70. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>ex vivo</i> μέτρησης πλάσματος αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.....	105

Εικόνα 71. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>ex vivo</i> μέτρησης πλάσματος αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ινών άνθρακα.....	105
Εικόνα 72. Αναπαράσταση με Excel της <i>ex vivo</i> μέτρησης πλήρους αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.	106
Εικόνα 73. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της <i>ex vivo</i> μέτρησης πλήρους αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.....	106
Εικόνα 74. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>ex vivo</i> μέτρησης πλήρους αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.....	107
Εικόνα 75. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>ex vivo</i> μέτρησης πλήρους αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.	107
Εικόνα 76. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>ex vivo</i> μέτρησης πλήρους αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.	108
Εικόνα 77. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>ex vivo</i> μέτρησης πλήρους αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.....	108
Εικόνα 78. Αναπαράσταση με Excel της <i>in vivo</i> μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.....	110
Εικόνα 79. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της <i>in vivo</i> μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.....	110
Εικόνα 80. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>in vivo</i> μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.....	111
Εικόνα 81. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>in vivo</i> μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.....	111
Εικόνα 82. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>in vivo</i> μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.....	112
Εικόνα 83. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>in vivo</i> μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.	112
Εικόνα 84. Αναπαράσταση με Excel της <i>in vivo</i> μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο γραφίτη.	113
Εικόνα 85. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της <i>in vivo</i> μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο γραφίτη.	113
Εικόνα 86. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>in vivo</i> μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο γραφίτη.	114

Εικόνα 87. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της <i>in vivo</i> μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο γραφίτη.	114
Εικόνα 88. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>in vivo</i> μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο γραφίτη.	115
Εικόνα 89. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της <i>in vivo</i> μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο γραφίτη.....	115
Εικόνα 90. Ταξινόμηση των DFT. Η αρίθμηση των συστάδων γίνεται από πάνω αριστερά και προς τα δεξιά.	117
Εικόνα 91. Ταξινόμηση των DTFT. Η αρίθμηση των συστάδων γίνεται από πάνω αριστερά και προς τα δεξιά.	118

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Κατανομή ιόντων εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης (3, 4).	30
---	----

Κατάλογος Εξισώσεων

Ειδικότερα, $E_K = \frac{RT}{ZF} \ln \left(\frac{[K]_0}{[K]_i} \right)$ (Εξίσωση 1), όπου, R είναι η σταθερά των αερίων, T η

θερμοκρασία σε *Kelvin*, Z το σθένος του καλίου (=1), F η σταθερά του Faraday και $[K^+]_o$ και $[K^+]_i$ η συγκέντρωση του καλίου στο εξωκυτταρικό και στο εσωκυτταρικό περιβάλλον αντίστοιχα. Η εξίσωση *Nerst* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να υπολογίσουμε το δυναμικό ισορροπίας οποιουδήποτε ιόντος. 31

Ειδικότερα, $V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_k[K]_0 + P_{Na}[Na]_0 + P_{Cl}[Cl]_i}{P_k[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_0} \right)$ (Εξίσωση 2), όπου, P_K , P_{Na}

και P_{Cl} , οι διαπερατότητες της μεμβράνης στα ιόντα καλίου, νατρίου και χλωρίου, αντίστοιχα. 32

Ειδικότερα, $E = E_0 - \frac{RT}{zF} \ln Q_r$ (Εξίσωση 3), όπου E είναι το δυναμικό του κυττάρου σε

θερμοκρασία T , E_0 είναι το δυναμικό ηρεμίας του κυττάρου, R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων, z είναι ο αριθμός των moles ή των ηλεκτρονίων που μεταφέρονται λόγω της αντίδρασης, F είναι η σταθερά Faraday και Q_r είναι ο λόγος της συγκέντρωσης των ουσιών που υφίστανται οξείδωση ($[S_{ox}]$) προς τη συγκέντρωση των ουσιών που υφίστανται αναγωγή ($[S_{red}]$). 47

Ειδικότερα, $\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln Q$ (Εξίσωση 4), όπου ΔG είναι η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια *Gibbs*, ΔG^0 είναι το δυναμικό του κυττάρου όταν $Q=1$, R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων, T είναι η θερμοκρασία και $\ln Q$ είναι ο λόγος των προϊόντων επί των αντιδρώντων. 47

Ειδικότερα, $u = \frac{x}{t}$ (Εξίσωση 5), όπου u είναι η ταχύτητα του χαρτιού, x η απόσταση που

διανύεται σε χρόνο t 66

Ειδικότερα, $T = \frac{x}{u}$ (Εξίσωση 6), όπου T είναι η περίοδος της δειγματοληψίας, x η

απόσταση που διανύεται και u η ταχύτητα του χαρτιού. 66

Ειδικότερα, $X(e^{j\omega}) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} x[n]e^{-j\omega n}$ (Εξίσωση 7), όπου $x[n]$ είναι το σήμα

διακριτού χρόνου και ω η συχνότητα. 69

Ειδικότερα, $x[n] = \frac{1}{2\pi} \int_{-\pi}^{+\pi} X(e^{j\omega}) e^{j\omega n} d\omega$ (Εξίσωση 8), όπου $X(e^{j\omega})$ είναι το

Φουριεριανό μετασχημάτισμα και ω η συχνότητα..... 69

Ειδικότερα, $X(e^{j\omega}) = X_R(e^{j\omega}) + jX_I(e^{j\omega})$ (Εξίσωση 9), όπου $X_R(e^{j\omega})$ το πραγματικό μέρος της συνάρτησης και $X_I(e^{j\omega})$ το φανταστικό μέρος της συνάρτησης, είτε

σε πολική μορφή, ως $X(e^{j\omega}) = |X(e^{j\omega})| e^{j\angle X(e^{j\omega})}$, όπου $|X(e^{j\omega})|$ το μέτρο της μιγαδικής συνάρτησης και $X(e^{j\omega})$ η γωνία της. 69

Ειδικότερα, $\sum_{n=-\infty}^{+\infty} |x[n]| < \infty$ (Εξίσωση 10), όπου $x[n]$ το σήμα διακριτού χρόνου. 70

Ειδικότερα, $\sum_{n=-\infty}^{+\infty} |x[n]|^2 < \infty$ (Εξίσωση 11), όπου $x[n]$ το σήμα διακριτού χρόνου. 70

Ειδικότερα, $X[k] = \sum_{n=0}^{N-1} x[n] e^{-j\frac{2\pi nk}{N}}$, $0 \leq k \leq N-1$ (Εξίσωση 12), όπου

όπου $x[n]$ το σήμα διακριτού χρόνου. 72

Ειδικότερα, $x[n] = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} X[k] e^{j\frac{2\pi nk}{N}}$, $0 \leq k \leq N-1$ (Εξίσωση 13), όπου $x[n]$,

$X(k)$ ο διακριτός μετασχηματισμός Fourier του $x[n]$ 73

Ειδικότερα, $X(e^{j\omega}) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} x[n] e^{-j\omega n} = \sum_{n=0}^{N-1} x[n] e^{-j\omega n}$ (Εξίσωση 14),

όπου $x[n]$ το σήμα διακριτού χρόνου, $X(e^{j\omega})$ ο μετασχηματισμός Fourier διακριτού χρόνου του $x[n]$, και ω η συχνότητα. 73

i. $C_i \neq \emptyset$, για $i = 1, \dots, m$, Εξίσωση 15..... 75

ii. $\bigcup_{i=1}^m C_i = X$, Εξίσωση 16..... 75

iii. $C_i \cap C_j = \emptyset$, για $i \neq j$ και $i, j = 1, \dots, m$, Εξίσωση 17..... 75

i. $u_j: X \rightarrow [0, 1]$, για $j = 1, \dots, m$, (Εξίσωση 18) 75

ii. και ισχύουν: $\sum_{j=1}^m u_j(x_i) = 1, i = 1, 2, \dots, N$, (**Εξίσωση 19**)..... 75

iii. καθώς $0 < \sum_{i=1}^N u_j(x_i) < N$, για $j = 1, 2, \dots, m$, (**Εξίσωση 20**). 75

$\theta_j = \frac{1}{|C_j|} \sum_{i \in C_j} x_i$, **Εξίσωση 21**, όπου $|C_j|$ το πλήθος των στοιχείων της j-στής συστάδας..... 80

$J(\theta) = \sum_{j=1}^k \sum_{i \in C_j} \|x_i - \theta_j\|^2$, **Εξίσωση 22** και η ανάθεση του διανύσματος x_i στη συστάδα C_j

γίνεται μέσω του κανόνα:..... 80

$C_j = \{x_i : \|x_i - \theta_j\|^2 \leq \|x_i - \theta_p\|^2, \forall j, p, j \neq p, 1, \dots, k, 1, \dots, k\}$, **Εξίσωση 23**. 81

$I_j = \sum_{x_i \in C_j} \|x_i - \theta_j\|^2$, **Εξίσωση 24**. 82

$S_k = \sum_{j=1}^k I_j$, **Εξίσωση 25**. 82

$f(K) = \begin{cases} 1, & \alpha \nu K = 1 \\ \frac{S_K}{\alpha_K S_{K-1}}, & \alpha \nu S_{K-1} \neq 0, \forall K > 1, \text{ **Εξίσωση 26**.} \\ 1, & \alpha \nu S_{K-1} = 0, \forall K > 1 \end{cases}$ 82

$\alpha_K = \begin{cases} 1 - \frac{3}{4N_d}, & \alpha \nu K = 2 \text{ και } N_d > 1 \\ \alpha_{K-1} + \frac{1 - \alpha_{K-1}}{6}, & \alpha \nu K > 2 \text{ και } N_d > 1 \end{cases}$, **Εξίσωση 27**. Όπου N_d : οι διαστάσεις του χώρου

δεδομένων και α_K : συντελεστής βάρους..... 83

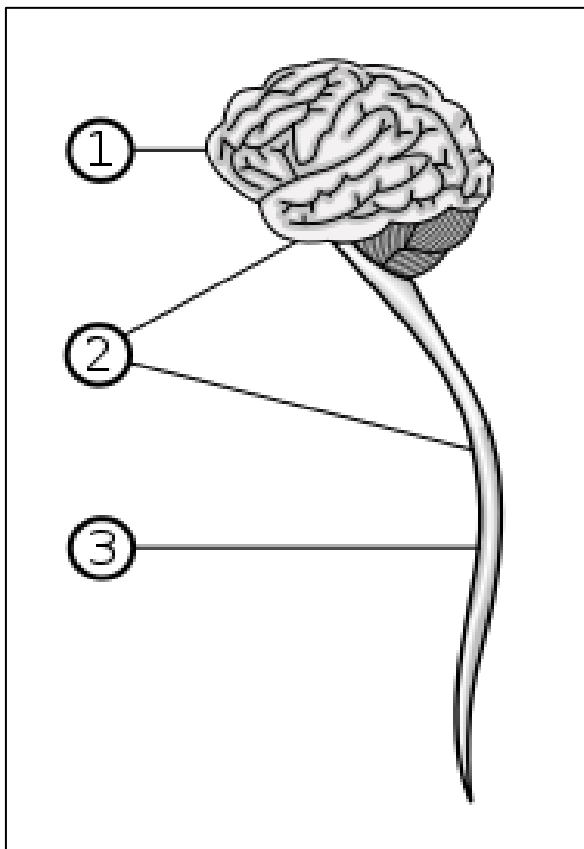
Κατάλογος Χημικών Αντιδράσεων

$AA \rightarrow DHA + ne^-$ (Χημική Αντίδραση 1).....	48
$DOQ + AA \xrightarrow{\text{Electrocatalysis}} DA + DHA$ (Χημική Αντίδραση 2).....	48

ΜΕΡΟΣ Ι
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1-ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

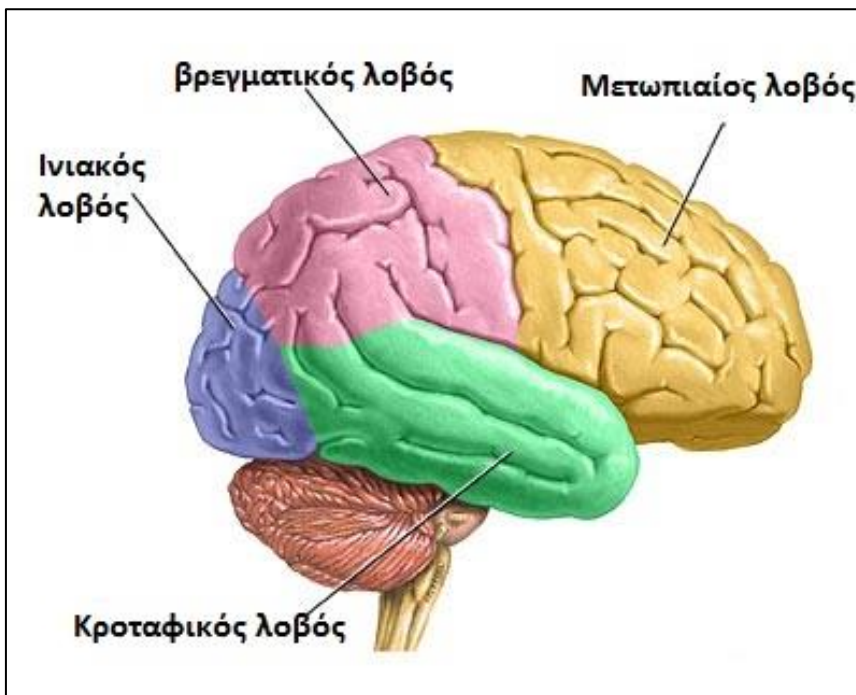
Το νευρικό σύστημα χωρίζεται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και στο Περιφερειακό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ). Το ΚΝΣ αποτελείται από επτά μέρη: τα εγκεφαλικά ημισφαίρια, τον μέσο εγκέφαλο, το διάμεσο εγκέφαλο, την παρεγκεφαλίδα, την γέφυρα, το νωτιαίο μυελό και τον προμήκη μυελό (**Εικόνα 1**). Τα εγκεφαλικά ημισφαίρια περιβάλλονται από τον φλοιό, ο οποίος με τη σειρά του υποδιαιρείται σε τέσσερις λοβούς: τον μετωπιαίο, τον κροταφικό, τον βρεγματικό και τον ινιακό (**Εικόνα 2**). Οι λοβοί είναι ανατομικά ανεξάρτητοι, ενώ φαίνεται πως το σύνολο των γνωστικών και γλωσσικών λειτουργιών του ανθρώπου εξαρτάται από τα μέρη αυτά του εγκεφαλικού φλοιού.



Εικόνα 1. Διάγραμμα του ΚΝΣ (2), που απλοποιείται σε δύο μέρη: εγκέφαλος (1) και νωτιαίος μυελός (3)¹.

Στο νευρικό σύστημα απαντώνται δύο κατηγορίες κυττάρων: τα νευρικά κύτταρα (νευρώνες) και τα νευρογλοιακά κύτταρα.

¹https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9A%CE%B5%CE%BD%CF%84%CF%81%CE%B9%CE%BA%CF%8C%CE%BD%CE%B5%CF%85%CF%81%CE%B9%CE%BA%CF%8C_%CF%83%CF%8D%CF%83%CF%84%CE%B7%CE%BC%CE%B1#/media/File:Central_nervous_system.svg

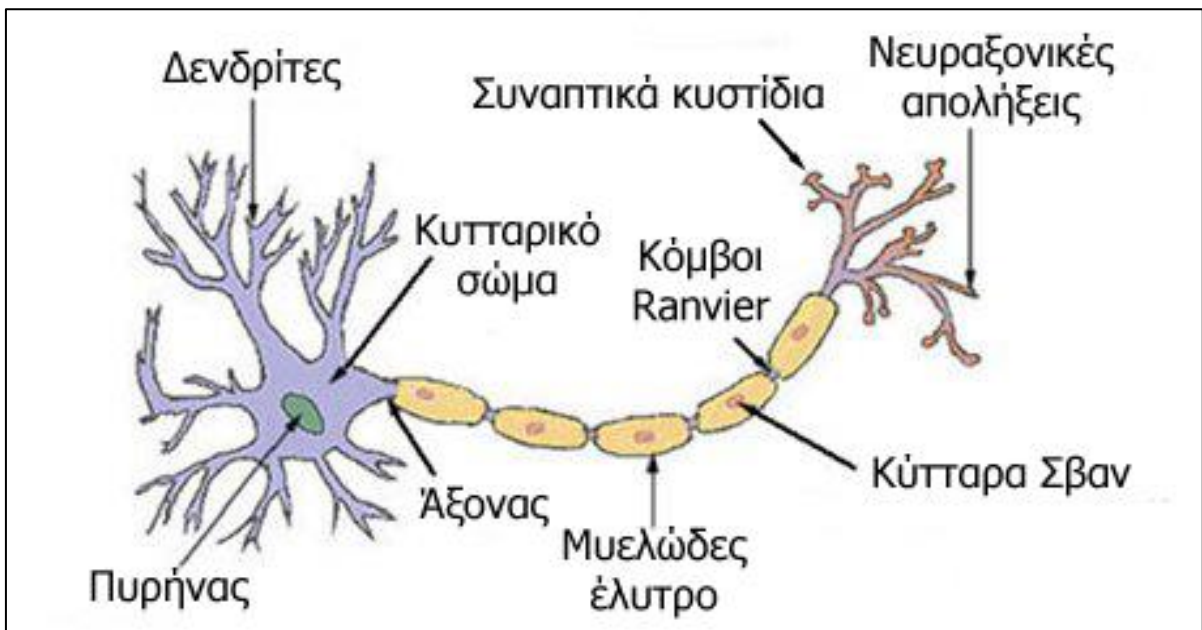


Εικόνα 2. Οι λοβοί του εγκεφαλικού φλοιού².

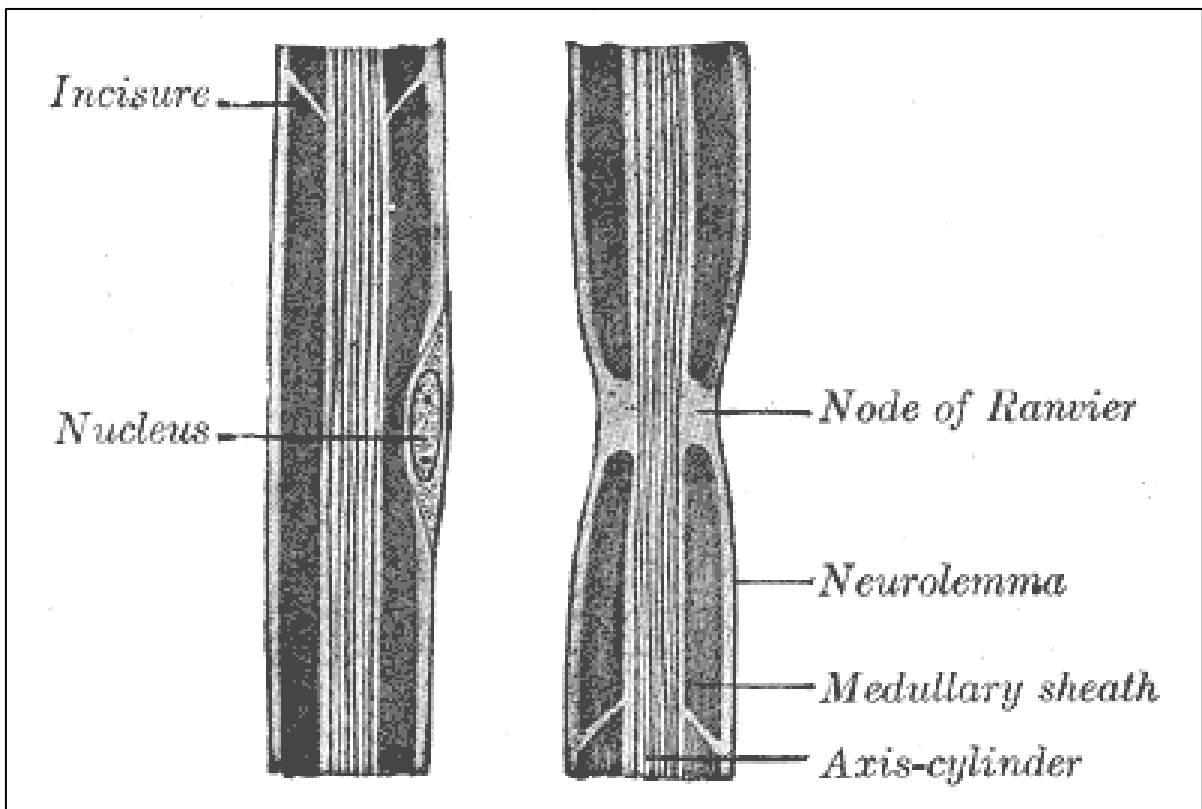
1.1. Ο Νευρώνας

Ο νευρώνας αποτελείται από τέσσερα μέρη: το κυτταρικό σώμα, το νευράξονα, τις απολήξεις του νευράξονα και τους δενδρίτες. Στο σώμα βρίσκεται ο πυρήνας του κυττάρου, που περιέχει τη γενετική πληροφορία, και όπου λαμβάνει χώρα η σύνθεση των πρωτεϊνών. Από το κυτταρικό σώμα εκβάλλουν οι δενδρίτες, όπου λειτουργούν ως υποδοχείς των σημάτων από άλλα νευρικά κύτταρα, και ο μοναδικός νευράξονας, που ξεκινά από μια προεκβολή του σώματος, τον εκφυτικό κώνο (Εικόνα 3). Ο νευράξονας διαβιβάζει τα σήματα προς τους άλλους νευρώνες. Έχει διάμετρο από 0.2μm έως 20μm και μήκος που ξεκινά από δέκατα του χιλιοστού και φτάνει τα 2 μέτρα. Ο νευράξονας καλύπτεται από ένα λιπώδες υλικό που ονομάζεται μυελώδες έλυτρο. Έχει μονωτικό ρόλο και επιταχύνει την διέλευση των σημάτων, όπως θα δούμε παρακάτω. Το μυελώδες έλυτρο διακόπτεται ανά κανονικά διαστήματα (~1-2mm) και ο νευράξονας εκτίθεται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Τα σημεία αυτά ονομάζονται κόμβοι Ranvier, και έχουν μήκος περίπου 2μm (Εικόνα 4) (1).

²<http://cmapspublic.ihmc.us/rid=1LLNK2N67-5FTNQW-DPW/lobes-of-the-brain.jpg>



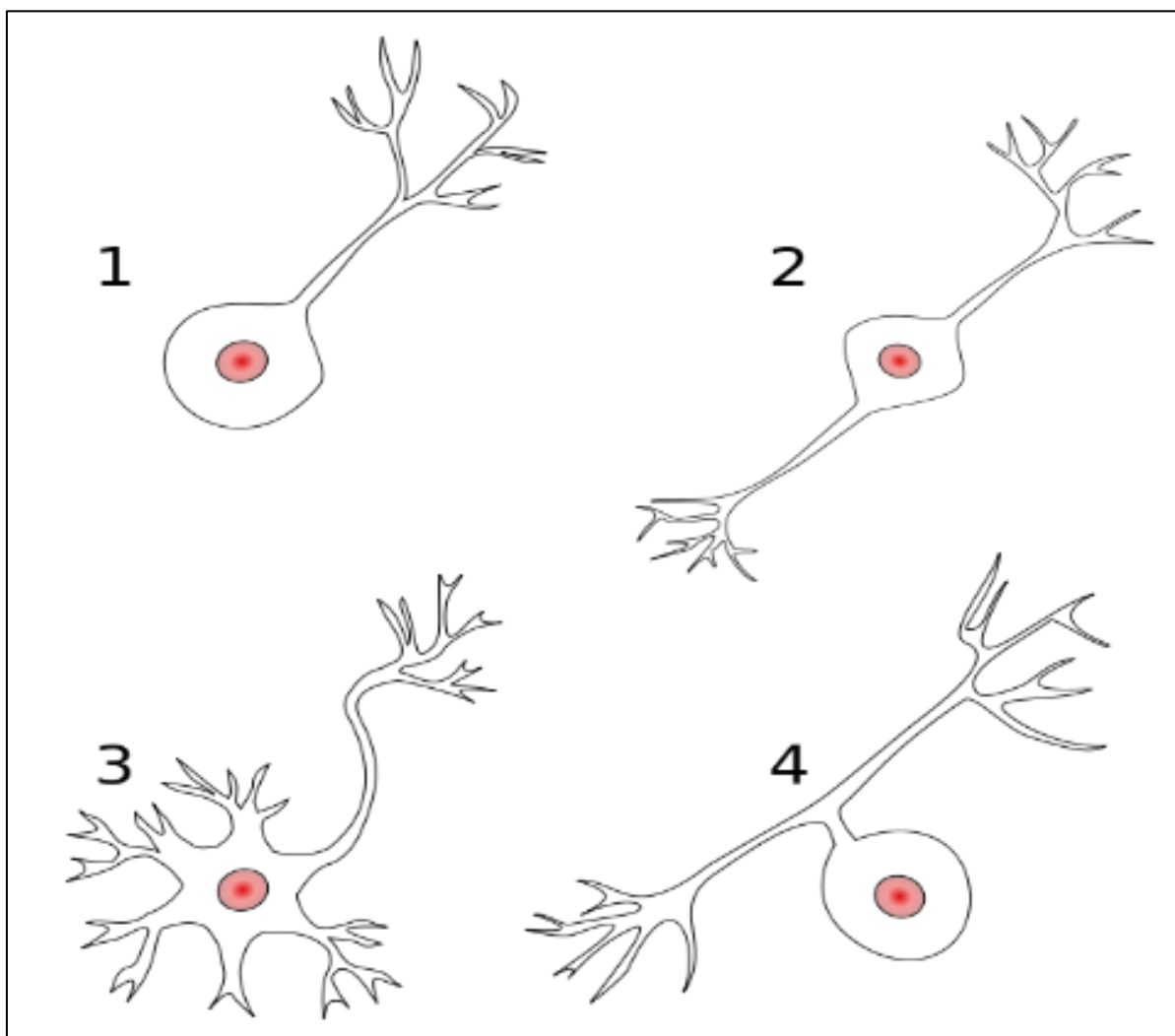
Εικόνα 3. Ο νευρώνας.



Εικόνα 4. Απεικόνιση του νευρικού άξονα ενός περιφερειακού νευρώνα, όπου φαίνονται οι κόμβοι Ranvier³.

³https://en.wikipedia.org/wiki/Node_of_Ranvier#/media/File:Gray631.png

Μπορούμε να ταξινομήσουμε τους νευρώνες με βάση διάφορα κριτήρια. Ανάλογα με τον αριθμό των αποφυάδων που εκκινούν από το κυτταρικό σώμα, οι νευρώνες χωρίζονται σε μονόπολους, δίπολους, πολύπολους και ψευδομονόπολους (**Εικόνα 5**, σχήματα 1, 2, 3, 4, αντίστοιχα).



Εικόνα 5. Τα είδη των νευρικών κυττάρων ανάλογα με τον αριθμό των αποφυάδων τους. Μονόπολα (1), δίπολα (2), πολύπολα (3), και ψευδομονόπολα (4)⁴.

Ανάλογα με το λειτουργικό ρόλο που επιτελούν οι νευρώνες, χωρίζονται σε προσαγωγούς (ή αισθητικούς) νευρώνες, απαγωγούς (ή κινητικούς), και διανευρώνες. Οι προσαγωγοί νευρώνες λαμβάνουν αισθητηριακές ή κινητικές πληροφορίες και τις μεταφέρουν στο νευρικό σύστημα, ενώ οι απαγωγοί νευρώνες μεταφέρουν εντολές προς τους αδένες ή τους μύς (1). Οι διανευρώνες αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα νευρώνων του νευρικού συστήματος (περίπου το 99% των νευρώνων) και βρίσκονται εξ ολοκλήρου στο Κεντρικό

⁴https://en.wikipedia.org/wiki/Neuron#/media/File:Neurons_uni_bi_multi_pseudouni.svg

Νευρικό Σύστημα. Εμφανίζουν μια ποικιλία στο μέγεθος, το σχήμα αλλά και τις λειτουργίες, όμως γενικά η αποστολή τους είναι να δρουν ως διάμεσοι μεταξύ των προσαγωγών και των απαγωγών νευρώνων (2).

1.1.1 Νευρογλοιακά κύτταρα

Παρά την προσήλωση της προσοχής μας στο νευρώνα, αυτός αποτελεί μόλις το 10% των κυττάρων του νευρικού συστήματος (2). Τα υπόλοιπα είναι τα νευρογλοιακά κύτταρα, τα οποία επιτελούν μια σειρά από σημαντικές λειτουργίες, όπως είναι η μυελίνωση, που περιγράφεται παρακάτω.

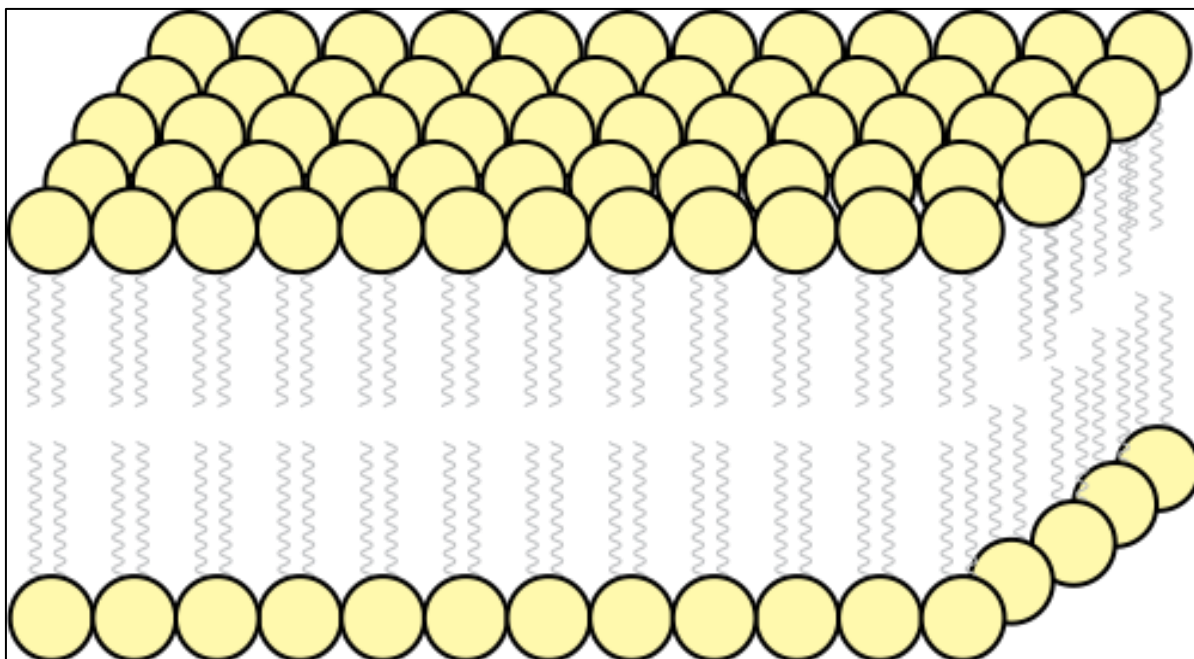
Οι κυριότεροι τύποι νευρογλοιακών κυττάρων είναι τα κύτταρα *Schwann*, τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα αστροκύτταρα. Τα κύτταρα *Schwann* βρίσκονται στο περιφερικό νευρικό σύστημα και σχηματίζουν το μυελώδες έλυτρο γύρω από τους νευράξονες (1, 2). Τα ολιγοδενδροκύτταρα αναλαμβάνουν και αυτά τη μυελίνωση των κυττάρων, στο κεντρικό νευρικό σύστημα όμως, καθώς και ρόλους στηρικτικούς στα νευρικά κύτταρα, που προσδίδουν δομική συνοχή στο νευρικό σύστημα. Τα αστροκύτταρα ελέγχουν τη συγκέντρωση των ιόντων K^+ στο εξωκυττάριο υγρό και συμμετέχουν στην πρόσληψη ή απομάκρυνση νευροδιαβιβαστών κατά τη διαδικασία της συναπτικής διαβίβασης (1, 2). Κάποια νευρογλοιακά κύτταρα λειτουργούν ως «απορριματοσυλλέκτες», απομακρύνοντας νεκρά νευρικά κύτταρα, ενώ άλλα συμμετέχουν στη δημιουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (1, 2).

Αξίζει να σημειωθεί πως, παρά το γεγονός ότι τα νευρογλοιακά κύτταρα πλειονηθούν στο νευρικό σύστημα, οι αποφυάδες τους διακλαδίζονται πολύ λιγότερο από αυτές των νευρώνων, με αποτέλεσμα να καταλαμβάνουν το 50% του όγκου του νευρικού συστήματος (1, 2).

1.2. Η Κυτταρική Μεμβράνη

Στην παράγραφο αυτή θα περιγράψουμε τη δομή και τη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς είναι καθοριστική για τη δημιουργία αλλά και την μετάδοση των ηλεκτρικών σημάτων μέσα σε ένα νευρώνα. Η κυτταρική μεμβράνη, πάχους 8-10nm, είναι μια διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων. Τα λιπίδια αυτά έχουν μια υδρόφιλη κεφαλή και ένα υδρόφοβο τμήμα αποτελούμενο από δύο υδρόφοβες «ουρές», με αποτέλεσμα όταν εκτεθούν σε ένα υδατικό μέσο να οργανώνονται με τέτοιο τρόπο ώστε οι υδρόφιλες κεφαλές να είναι

εκτεθειμένες στο εξωτερικό περιβάλλον ενώ οι υδρόφοβες ουρές να διατηρούνται στο εσωτερικό του λιπιδικού στρώματος (**Εικόνα 6**) (3, 4).



Εικόνα 6. Η κυτταρική μεμβράνη ως διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων, με τις υδρόφιλες κεφαλές εκατέρωθεν προς τα έξω και τις υδρόφοβες ουρές στο εσωτερικό⁵.

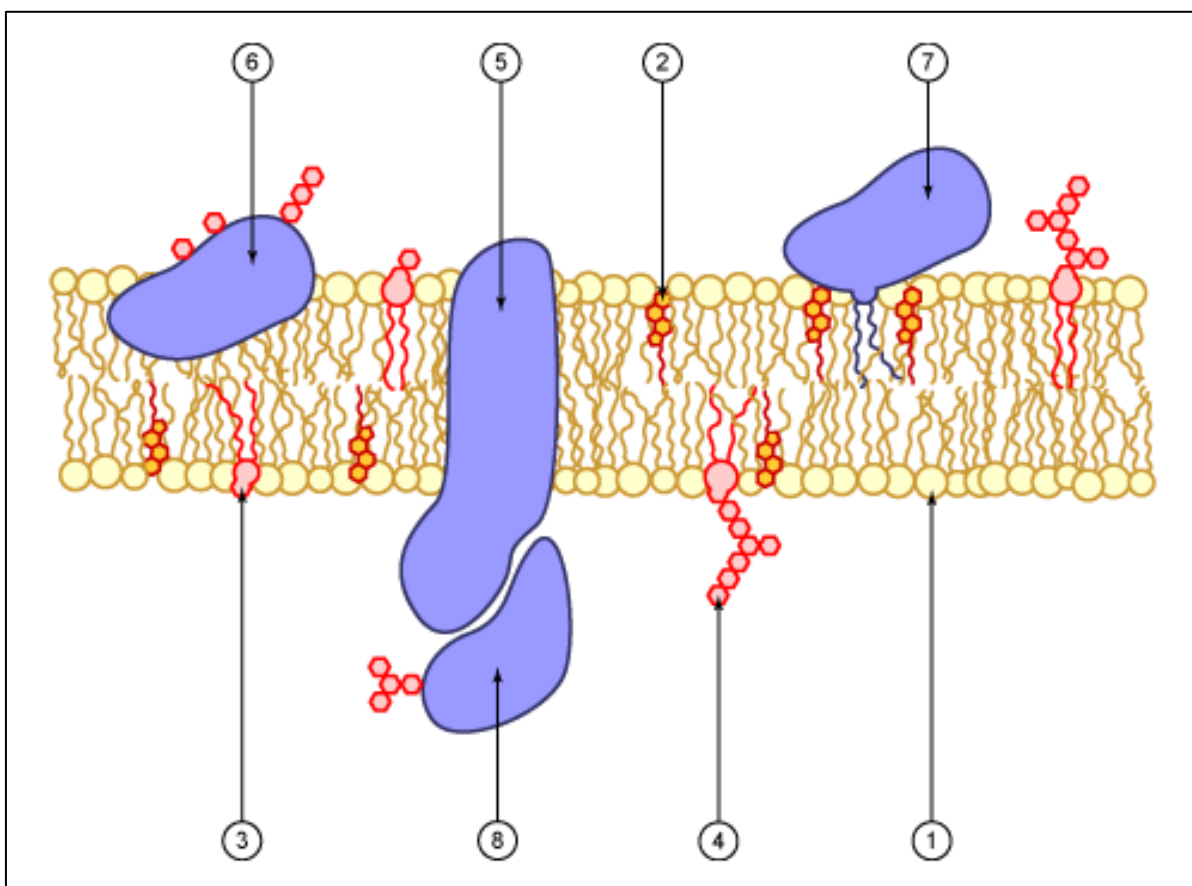
Η λιπιδική διπλοστιβάδα θα ήταν αδιαπέραστη, αν ταυτόχρονα δεν ήταν ενσωματωμένες πρωτεΐνες που λειτουργούν ως διάλυτοι ιόντων αλλά και άλλων ουσιών απαραίτητων για τη λειτουργία της μεμβράνης, καθιστώντας την ημιπερατή (**Εικόνα 7**).

Οι διάλυτοι ιόντων είναι υπεύθυνοι για την εκατέρωθεν της μεμβράνης διέλευση των ιόντων καλίου (K^+), νατρίου (Na^+) και χλωρίου (Cl^-), καθώς επίσης διατηρούν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του δυναμικού ηρεμίας και του δυναμικού δράσης της μεμβράνης, όπως θα δούμε και παρακάτω. Το ενδιαφέρον για τη μελέτη της συνεισφοράς τους στη λειτουργία των νευρικών κυκλωμάτων είναι αυξανόμενο, καθώς ήδη υπάρχουν ασθένειες που αποδίδονται σε ελαττωματική λειτουργία των διόδων ιόντων (σύνδρομο *Lambert-Eaton*, βαριά μυασθένεια), υπάρχει προσπάθεια κατάταξης και άλλων τέτοιων ασθενειών, καθώς και μια μελλοντική προοπτική ή δυνατότητα δημιουργίας φαρμάκων για κάποιες νευρολογικές ή ψυχικές διαταραχές, που θα επεμβαίνουν κατ' ευθείαν στους διαύλους αυτούς (3, 4).

⁵https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_membrane#/media/File:Fluid_Mosaic.svg

1.2.1. Χαρακτηριστικά των Διαύλων Ιόντων

Όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, οι διάυλοι ιόντων είναι πρωτεΐνες που άγουν ιόντα, διακρίνονται όμως από μια αυστηρή επιλεκτικότητα. Για παράδειγμα, οι διάυλοι K^+ είναι διαπερατοί στα ιόντα καλίου αλλά αδιαπέραστοι από τα ιόντα Na^+ ή Cl^- . Το ίδιο ισχύει για τους διάυλους Na^+ , οι οποίοι είναι διαπερατοί 10 έως 20 φορές παραπάνω στα ιόντα νατρίου απ' ό τι στα ιόντα καλίου (3, 4).



Εικόνα 7. Λεπτομερής εικόνα της κυτταρικής μεμβράνης, όπου φαίνονται τα φωσφολιπίδια (1), χοληστερόλη, γλυκολιπίδια και σάκχαρα (2, 3, και 4, αντίστοιχα), ενώ στους αριθμούς 5, 6, 7 και 8 φαίνονται οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως διάυλοι ιόντων⁶.

Ένα άλλο διαχωριστικό χαρακτηριστικό των διαύλων, είναι ο τρόπος ρύθμισής τους. Θα μπορούσαμε εδώ να διακρίνουμε τρεις κατηγορίες: διαύλους ελεγχόμενους από τάση (τασεοελεγχόμενοι διάυλοι), διαύλους ελεγχόμενους από χημικές ουσίες και διαύλους ελεγχόμενους μηχανικά (από την πίεση). Θα προσθέσουμε εδώ και τους διαύλους που είναι ανοιχτοί σε κατάσταση δυναμικού ηρεμίας, είναι καθοριστικοί για τη διατήρηση αυτού του δυναμικού και δεν επηρεάζονται από εξωτερικά σήματα (πχ. τάση, χημικοί διαβιβαστές,

⁶https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9A%CF%85%CF%84%CF%84%CE%B1%CF%81%CE%B9%CE%BA%CE%AE_%CE%BC%CE%B5%CE%BC%CE%B2%CF%81%CE%AC%CE%BD%CE%B7#/media/File:Cell_membrane_scheme.png

κλπ.). Οι τασεοελεγχόμενοι διάλυτοι (πχ. διάλυλος νατρίου) ανοίγουν όταν βρεθούν υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, συνήθως με τη μεταβολή σε ένα κομμάτι της διάπλάσής τους. Στους χημικά ελεγχόμενους διαλύτες, η κατάλληλη χημική ουσία προσδένεται σε μια ιδιαίτερη θέση υποδοχής, προκαλώντας τη διάνοιξη του διαλύου μέσω της παροχής ενέργειας.

Αξίζει να σημειωθεί ότι μόλις ένας ελεγχόμενος διάλυλος ανοίξει, θα παραμείνει σε αυτή την κατάσταση για μερικά χιλιοστά του δευτερολέπτου και ύστερα θα κλείσει για αντίστοιχο χρονικό διάστημα, μέχρι να ξαναανοίξει.

1.2.2. Δυναμικό Ηρεμίας της Μembrάνης

Το δυναμικό ηρεμίας οφείλεται στην άνιση κατανομή ιόντων στο ενδοκυτταρικό και στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Τα ιόντα που συνήθως υπάρχουν εκατέρωθεν της μεμβράνης είναι τα ιόντα καλίου, νατρίου και χλωρίου, με τα πρώτα να βρίσκονται σε συντριπτικά μεγαλύτερη συγκέντρωση στο ενδοκυτταρικό υγρό και τα δύο επόμενα να απαντώνται κυρίως στο εξωκυτταρικό υγρό. Ένα ενδεικτικό παράδειγμα φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) (3, 4).

Ιόν	Συγκέντρωση στον εξωκυττάριο χώρο (nmol/L)	Συγκέντρωση στον ενδοκυττάριο χώρο (nmol/L)
Na ⁺	150	15
Cl ⁻	110	10
K ⁺	5	150

Πίνακας 1. Κατανομή ιόντων εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης (3, 4).

Σε κατάσταση ηρεμίας, υπάρχει περίσσεια αρνητικών ιόντων στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον και περίσσεια θετικών ιόντων στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Τα ιόντα αυτά συγκεντρώνονται κυρίως σε στρώματα εκατέρωθεν της μεμβράνης, με αποτέλεσμα τα μεγαλύτερα μέρη εσωτερικά και εξωτερικά του κυττάρου να είναι ηλεκτρικώς ουδέτερα (3, 4). Θα περιγράψουμε πώς διαμορφώνεται η τιμή του δυναμικού ηρεμίας, αφού διασαφηνίσουμε πως εξαρτάται από δύο παράγοντες: α) τη συγκέντρωση των διαφόρων ιόντων εκατέρωθεν της μεμβράνης, και β) τη διαπερατότητα της μεμβράνης στα διάφορα ιόντα, δηλαδή το είδος των μη ελεγχόμενων διαλύων που υπάρχουν στη μεμβράνη και η ειδική επιτρεπτότητά τους σε ιόντα.

Ας θεωρήσουμε αρχικά τη μεμβράνη ενός κυττάρου που έχει ανοιχτούς μόνο διαύλους καλίου. Λόγω της περίσσειας τέτοιων ιόντων στο εσωτερικό του κυττάρου, ιόντα καλίου θα αρχίσουν να εξέρχονται από την μεμβράνη μέσω των ανοιχτών διαύλων, με αποτέλεσμα στον εσωκυτταρικό χώρο να κυριαρχεί τώρα αρνητικό φορτίο και στον εξωκυτταρικό θετικό φορτίο, διαμορφώνοντας έτσι μια διαφορά δυναμικού κατά μήκος της μεμβράνης. Λόγω αυτής της διαφοράς δυναμικού, υπάρχει μια ταυτόχρονη κίνηση ιόντων καλίου από το εξωκυτταρικό στο εσωκυτταρικό περιβάλλον. Το δυναμικό μεμβράνης στο οποίο η κίνηση λόγω της διάχυσης ισορροπείται με την κίνηση λόγω της ηλεκτρικής δύναμης, ονομάζεται δυναμικό ισορροπίας του καλίου, και μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση *Nerst* (3, 4):

$$E_K = \frac{RT}{ZF} \ln \left(\frac{[K]_o}{[K]_i} \right) \quad (1)$$

Ειδικότερα, $E_K = \frac{RT}{ZF} \ln \left(\frac{[K]_o}{[K]_i} \right)$ (**Εξίσωση 1**), όπου, R είναι η σταθερά των αερίων, T η θερμοκρασία σε *Kelvin*, Z το σθένος του καλίου (=1), F η σταθερά του Faraday και $[K^+]_o$ και $[K^+]_i$ η συγκέντρωση του καλίου στο εξωκυτταρικό και στο εσωκυτταρικό περιβάλλον αντίστοιχα. Η εξίσωση *Nerst* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να υπολογίσουμε το δυναμικό ισορροπίας οποιουδήποτε ιόντος.

Στην περίπτωση που η μεμβράνη του κυττάρου είναι διαπερατή μόνο σε ένα ιόν, τότε το δυναμικό ισορροπίας του συγκεκριμένου ιόντος ταυτίζεται με το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης, και υπολογίζεται από την εξίσωση *Nerst*. Παράδειγμα αυτής της περίπτωσης αποτελεί η μεμβράνη των νευρογλοιακών κυττάρων, που είναι διαπερατή μόνο στο κάλιο (3, 4).

Ας δούμε τώρα την περίπτωση του νευρώνα, του οποίου η μεμβράνη είναι διαπερατή σε κάλιο και σε νάτριο (με τους διαύλους καλίου να είναι αρκετά περισσότεροι). Ιόντα νατρίου κινούνται προς το εσωτερικό του κυττάρου λόγω δυνάμεων διάχυσης αλλά και λόγω της έλξης από την περίσσεια αρνητικού φορτίου στο εσωτερικό περιβάλλον. Η εισροή αυτή των ιόντων νατρίου προκαλεί *εκπόλωση* της μεμβράνης (μείωση δηλαδή της αρνητικής τιμής του δυναμικού), με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ισορροπία των ιόντων καλίου. Η εκπόλωση του δυναμικού προκαλεί μείωση της ηλεκτρικής δύναμης που ωθεί τα ιόντα καλίου στο εσωτερικό του κυττάρου, με αποτέλεσμα να παρατηρείται αυξημένη εκροή ιόντων καλίου από το κύτταρο. Αυτή η εκροή ιόντων K^+ τείνει να εξισορροπήσει την εισροή ιόντων Na^+ . Η τιμή του δυναμικού μεμβράνης όπου οι δύο αυτές αντιτιθέμενες κινήσεις εξισορροπούνται

είναι η τιμή του δυναμικού ηρεμίας της μεμβράνης, το οποίο διαφέρει και από το δυναμικό ισορροπίας του καλίου και από το δυναμικό ισορροπίας του νατρίου. Ενδεικτικά, $E_K = -75\text{mV}$, $E_{Na} = 55\text{mV}$, ενώ το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης κυμαίνεται από -60 έως -70mV (3, 4). Αυτό βέβαια ισχύει για τα νευρικά κύτταρα όπου και πάλι μπορεί να παρατηρηθεί μια διακύμανση μεταξύ -40 έως -80mV στο δυναμικό ηρεμίας. Στα μυϊκά κύτταρα το δυναμικό ηρεμίας φτάνει στα -90mV .

Στο δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης, η ισορροπία των επιμέρους ιόντων είναι διαταραγμένη. Αυτή τη διαταραχή εξισορροπείται από την αντλία νατρίου-καλίου, η οποία εισάγει δύο ιόντα K^+ για κάθε τρία ιόντα Na^+ που εξάγει. Η λειτουργία της αντλίας νατρίου-καλίου απαιτεί την κατανάλωση μεταβολικής ενέργειας του κυττάρου, και υπό αυτή την έννοια το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης δεν αποτελεί μια κατάσταση ισορροπίας, παρά μια σταθερή κατάσταση που επιτυγχάνεται με τη μεταβολική δραστηριότητα του κυττάρου (3, 4). Γενικά, αν υποθέσουμε ότι στη διαμόρφωση του δυναμικού ηρεμίας συμμετέχουν ιόντα K^+ , Na^+ και Cl^- , τότε η τιμή του δυναμικού ηρεμίας δίνεται από την εξίσωση Goldman:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_k [K]_0 + P_{Na} [Na]_0 + P_{Cl} [Cl]_i}{P_k [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_0} \right) \quad (2)$$

Ειδικότερα, $V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_k [K]_0 + P_{Na} [Na]_0 + P_{Cl} [Cl]_i}{P_k [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_0} \right)$ (Εξίσωση 2), όπου, P_K , P_{Na}

και P_{Cl} , οι διαπερατότητες της μεμβράνης στα ιόντα καλίου, νατρίου και χλωρίου, αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι αν η διαπερατότητα της μεμβράνης σε ένα ιόν κυριαρχεί επί των άλλων, αν για παράδειγμα $P_K \gg P_{Na}, P_{Cl}$, τότε η εξίσωση Goldman ανάγεται στην εξίσωση Nernst:

$$V_m = \frac{RT}{ZF} \ln \left(\frac{[K]_0}{[K]_i} \right) \quad (3)$$

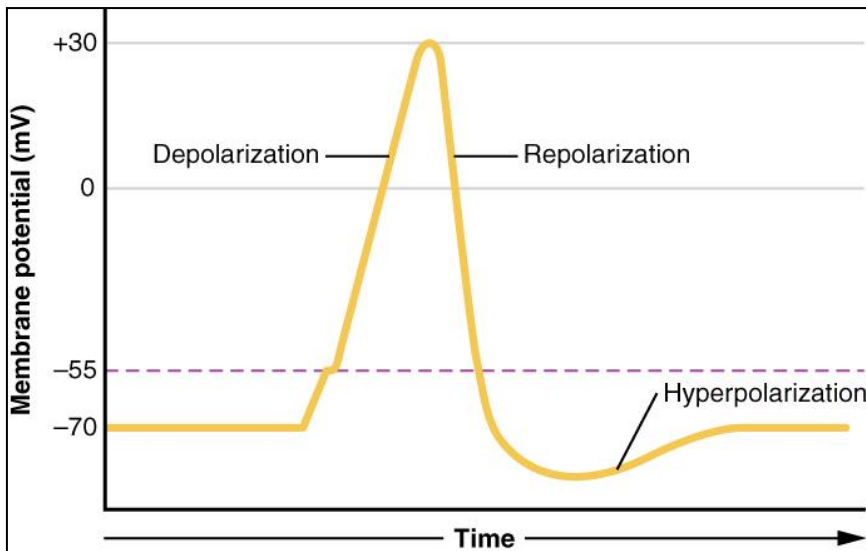
Συμπερασματικά, το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης βρίσκεται κοντινότερα στο δυναμικό ισορροπίας του ιόντος με την επικρατούσα διαπερατότητα, δηλαδή με το μεγαλύτερο αριθμό ανοιχτών διόδων στην ηρεμία.

1.3. Κυτταρική επικοινωνία

Παραπάνω περιγράψαμε συνοπτικά τη δομή του νευρικού κυττάρου, και εν συνεχεία τη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία σε κατάσταση ηρεμίας είναι διαπερατή σε ιόντα καλίου, νατρίου και χλωρίου, αποκλείοντας μόνο ογκώδη οργανικά ανιόντα (A^-) (π.χ. πρωτεΐνες, αμινοξέα) που αδυνατούν να περάσουν τη μεμβράνη. Η κυτταρική μεμβράνη ωστόσο, των νευρογλοιακών κυττάρων είναι διαπερατή μόνο στο κάλιο (5).

Θα αναφερθούμε τώρα στην επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων. Η επικοινωνία αυτή επιτυγχάνεται με την χρήση ηλεκτρικών σημάτων (δυναμικά ενέργειας και συναπτικά δυναμικά) και χημικών σημάτων (νευροδιαβιβαστές, όπως το γλουταμικό, GABA, κλπ.).

Τα ηλεκτρικά σήματα στο εσωτερικό του κυττάρου οφείλονται σε στιγμιαίες μεταβολές του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης από το δυναμικό ηρεμίας. Πιο συγκεκριμένα, η κυτταρική μεμβράνη εκτός της ηρεμίας, μπορεί να παρουσιάσει τρεις καταστάσεις: α) την εκπόλωση, όπου το δυναμικό της μεμβράνης πλησιάζει προς το μηδέν (είναι δηλαδή λιγότερο αρνητικό) ή παίρνει ακόμα και θετικές τιμές, β) την υπερπόλωση, όπου το δυναμικό της μεμβράνης γίνεται περισσότερο αρνητικό και, γ) την επαναπόλωση, όπου μια εκπολωμένη ή υπερπολωμένη μεμβράνη τείνει να επιστρέψει στην κατάσταση ηρεμίας της (**Εικόνα 8**).



Εικόνα 8. Γραφική παράσταση του δυναμικού της μεμβράνης συναρτήσει του χρόνου t . Φαίνεται το δυναμικό ηρεμίας, στα -70mV , η εκπόλωση (depolarization), η υπερπόλωση (hyperpolarization) και η επαναπόλωση (repolarization) της μεμβράνης⁷.

1.3.1. Συναπτικά δυναμικά

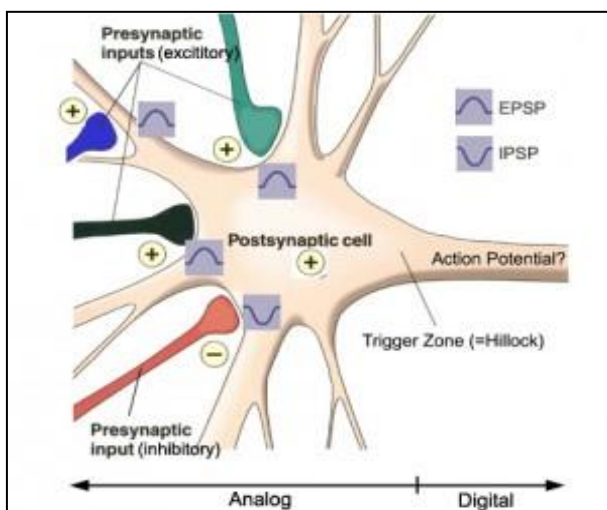
Τα συναπτικά δυναμικά δημιουργούνται στους δενδρίτες του κυττάρου που δέχεται την πληροφορία (το οποίο θα ονομάζουμε στο εξής, μετασυναπτικό κύτταρο, ενώ το κύτταρο που στέλνει την πληροφορία θα το ονομάζουμε προσυναπτικό κύτταρο). Προκαλούνται από το άνοιγμα υποδοχέων που καθιστούν το δυναμικό του μετασυναπτικού νευρώνα πιο αρνητικό ή πιο θετικό, λειτουργούν συνεπώς είτε διεγερτικά προς την κατεύθυνση της εκπόλωσης, είτε

⁷https://en.wikipedia.org/wiki/Depolarization?fbclid=IwAR21Z6KScMwaJgJm0o8i35mM0aiguc0BWaWv1eZF3B9MLzRIG-nPTPev1YY#/media/File:1221_Action_Potential.jpg

ανασταλτικά, προς την κατεύθυνση της υπερπόλωσης. Με βάση αυτήν τους τη λειτουργία χωρίζονται σε διεγερτικά μετασυναπτικά δυναμικά (excitatory postsynaptic potential-EPSP) και ανασταλτικά μετασυναπτικά δυναμικά (inhibitory postsynaptic potential-IPSP) (**Εικόνα 9**).

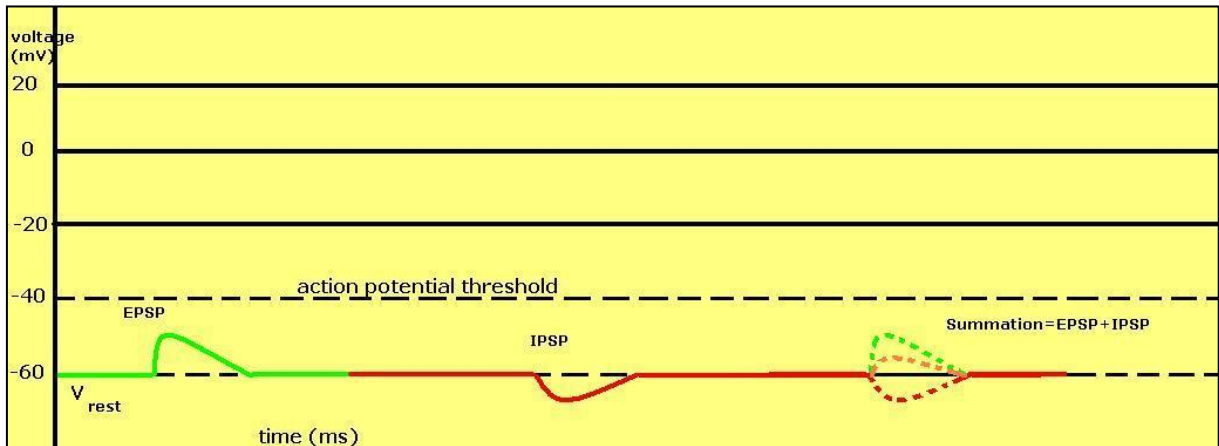
Τα συναπτικά δυναμικά φθίνουν 1-2mm από το σημείο διέγερσης και λειτουργούν σε πολύ μικρές αποστάσεις (6). Έχουν εύρος της τάξης των λίγων mV. Η λειτουργία τους μπορεί απλοποιητικά να περιγραφεί ως εξής: τα μετασυναπτικά δυναμικά που δημιουργούνται στους δενδρίτες του μετασυναπτικού κυττάρου, και που είναι δύο ειδών (EPSP και IPSP), αθροίζονται και αν το αποτέλεσμα ξεπερνάει ένα κατώφλι (ουδό) δυναμικού, τότε δημιουργείται ένα δυναμικό ενέργειας που οδηγεί σε μετέπειτα απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, όπως θα δείξουμε παρακάτω. Αν η συναπτική ολοκλήρωση δεν ξεπεράσει τον ουδό δυναμικού, αν δηλαδή τα IPSP υπερέχουν, τότε το κύτταρο αναστέλλεται, τίθεται δηλαδή εκτός λειτουργίας (7) (**Εικόνα 10**).

Παράδειγμα χημικής ουσίας που προκαλεί EPSP είναι το γλουταμικό οξύ, ενώ το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) προκαλεί IPSP. Σημειώνουμε ότι οι παραπάνω δύο νευροδιαβιβαστές είναι κυρίαρχοι στη μεταφορά πληροφορίας μεταξύ των νευρικών κυττάρων, καθώς απελευθερώνονται από το 90% περίπου των συνάψεων του νευρικού συστήματος (7).



Εικόνα 9. Οι απολήξεις του νευράξονα του προσυναπτικού κυττάρου καταλήγουν στο κυρίως σώμα ή στους δενδρίτες του μετασυναπτικού κυττάρου. Εκεί προκαλούν δύο ειδών δυναμικά, διεγερτικά (EPSP) ή ανασταλτικά (IPSP)⁸.

⁸<https://antranik.org/actions-of-excitatory-and-inhibitory-neurotransmitters/>



Εικόνα 10. Το κατώφλι δυναμικού τοποθετείται στα -40mV . Φαίνεται ένα διεγερτικό μετασυναπτικό δυναμικό (EPSP, πράσινη γραμμή), ένα ανασταλτικό μετασυναπτικό δυναμικό (IPSP, κόκκινη γραμμή), και τέλος η άθροισή τους (πορτοκαλί διακεκομμένη γραμμή), που δεν ξεπερνάει τον ουδό δυναμικού και άρα δεν δημιουργεί δυναμικό ενέργειας⁹.

1.3.2. Δυναμικά ενέργειας

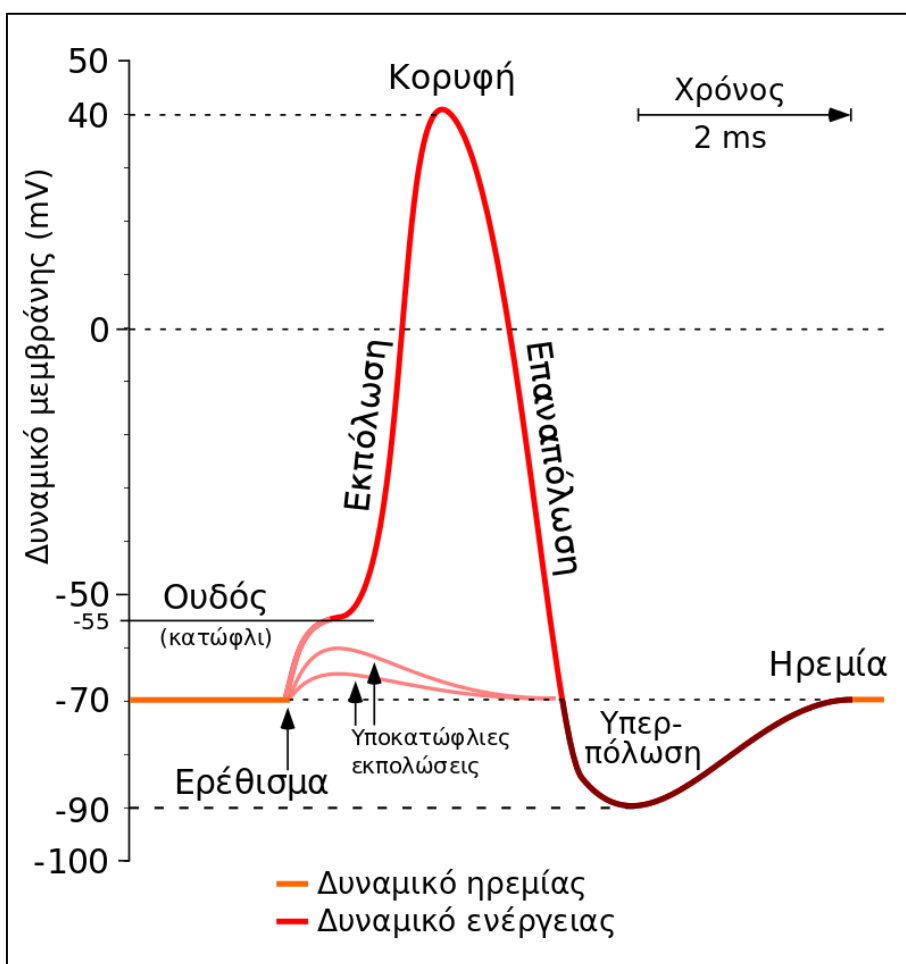
Όπως περιγράψαμε στην προηγούμενη παράγραφο, εάν τα μετασυναπτικά δυναμικά ξεπεράσουν ένα κατώφλι δυναμικού, τότε πυροδοτείται ένα δυναμικό ενέργειας. Το κατώφλι αυτό δυναμικού απέχει περίπου 15mV από το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης. Αν για παράδειγμα το δυναμικό ηρεμίας είναι -70mV , τότε η ολοκλήρωση των μετασυναπτικών δυναμικών πρέπει να φτάσει στα -55mV , για να δημιουργηθεί ένα δυναμικό ενέργειας.

Το δυναμικό ενέργειας είναι το βασικό ηλεκτρικό σήμα στη λειτουργία των νευρώνων (**Εικόνα 11**). Το δυναμικό ενέργειας εκκινεί από τον εκφυτικό κώνο του νευρώνα και διαδίδεται με ταχύτητα που κυμαίνεται από 1 μέχρι 100m ανά δευτερόλεπτο. Έχει διάρκεια περίπου 1ms και διαφέρει από τα συναπτικά δυναμικά ως εξής: α) μεταδίδεται σε μεγάλες αποστάσεις, β) έχει εύρος που κυμαίνεται από τα 100 ως τα 130mV και, γ) δεν εξασθενεί κατά την διάδοσή του. Είναι σήμα του τύπου όλων ή ουδέν, με την έννοια ότι μόλις ξεπεραστεί το κατώφλι δυναμικού δημιουργείται πάντα το ίδιο σήμα, και ότι διατηρείται σταθερό σε όλο το μήκος της διάδοσής του, που μπορεί να φτάσει και τα 3 μέτρα. Ανεξάρτητα δηλαδή από την ένταση των ερεθισμάτων, το δυναμικό ενέργειας έχει πάντα το ίδιο εύρος σε mV και την ίδια χρονική διάρκεια. Το στοιχείο που αλλάζει είναι η συχνότητα εμφάνισης και ο αριθμός των δυναμικών ενέργειας. Συγκεκριμένα, το εύρος του ερεθίσματος

⁹https://en.wikipedia.org/wiki/Inhibitory_postsynaptic_potential?fbclid=IwAR1MD0iX1fyQGTR6Lomn8JrrxT7htKHLZq_7MAY1SvQUdH-WsAE6xwEABqI#/media/File:IPSPsummation.JPG

επηρεάζει τη συχνότητα των δυναμικών ενέργειας ενώ η διάρκεια του ερεθίσματος επηρεάζει τον αριθμό των δυναμικών (5).

Στην αρχή του κεφαλαίου αναφέραμε πως ο νευράξονας των κυττάρων καλύπτεται από ένα λιπώδες μονωτικό υλικό, που ονομάζεται μυελώδες έλυτρο. Το μυελώδες έλυτρο εξασφαλίζει την ταχεία αγωγή των δυναμικών ενέργειας, ενώ τα σημεία όπου αυτό διακόπτεται, οι κόμβοι Ranvier, χρησιμοποιούνται για την αναγέννηση του σήματος.



Εικόνα 11. Δυναμικό ενέργειας¹⁰.

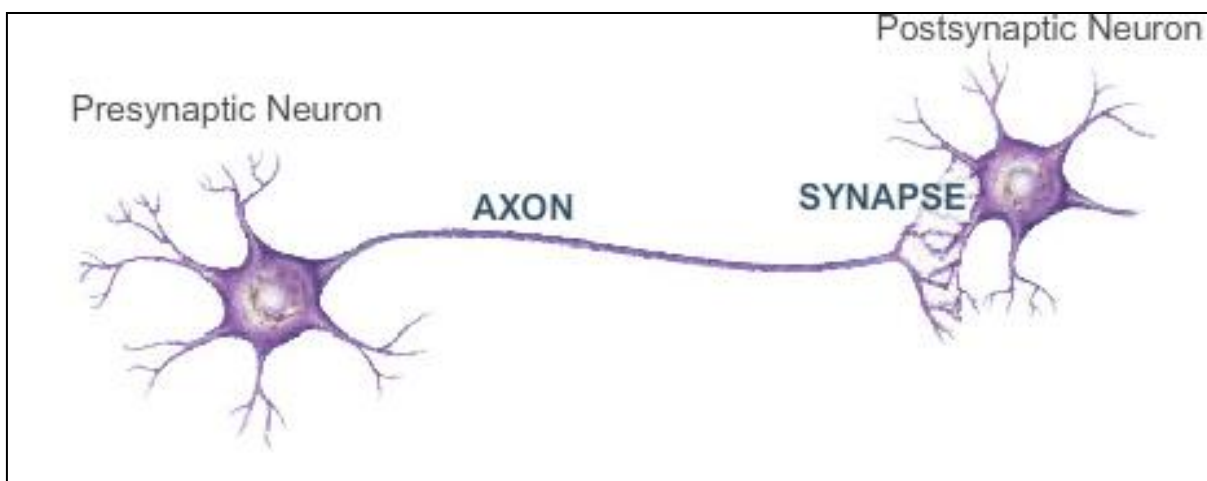
Με όσα περιγράψαμε παραπάνω γίνεται φανερό ότι τα δυναμικά ενέργειας είναι σήματα αυστηρά τυποποιημένα σε όλο το νευρικό σύστημα, την ίδια στιγμή που προκαλούνται από μια ποικιλία εξωτερικών ερεθισμάτων/γεγονότων (επαφή, ακουστικό ή οπτικό ερέθισμα, κλπ.). Τα σήματα δηλαδή που προκαλούνται από διαφορετικών ειδών ερεθίσματα είναι

¹⁰https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%94%CF%85%CE%BD%CE%B1%CE%BC%CE%B9%CE%BA%CF%8C%CE%B5%CE%BD%CE%AD%CF%81%CE%B3%CE%B5%CE%B9%CE%B1%CF%82?fbclid=IwAR3QxENP6ccIy0QfzeUC32x_0LbBoWG-HS475DU0asHaAXVeBPKcxmVF_qM#/media/File:Aktionspotential_el.svg

πανομοιότυπα. Το είδος της πληροφορίας που μεταφέρεται δεν καθορίζεται από τον τύπο του σήματος/δυναμικού ενέργειας, αλλά από τις νευρικές οδούς που μεταφέρεται (5).

1.3.3. Νευροδιαβίβαση

Τα νευρικά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους μέσω μιας εξειδικευμένης τοπολογίας που ονομάζεται σύναψη. Επαναλαμβάνουμε εδώ ότι το κύτταρο που στέλνει πληροφορία λέγεται προσυναπτικό και το κύτταρο που τη λαμβάνει λέγεται μετασυναπτικό (**Εικόνα 12**).



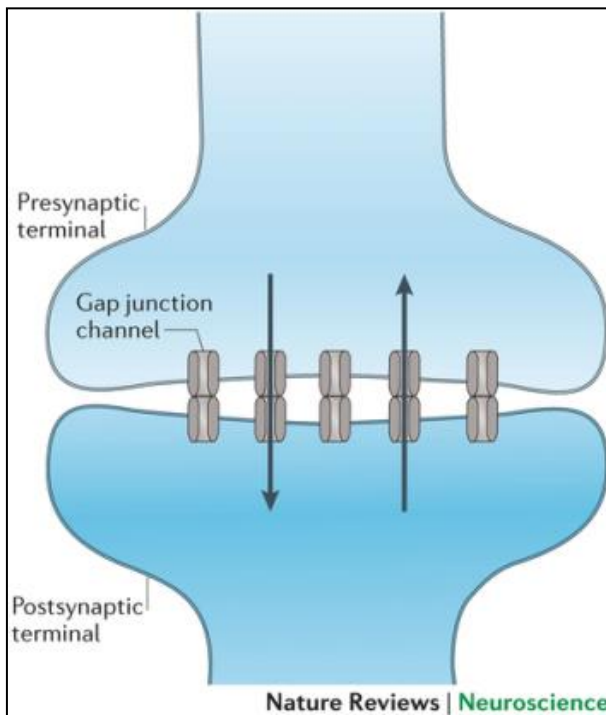
Εικόνα 12. Απεικόνιση του προσυναπτικού και του μετασυναπτικού κυττάρου που συμμετέχουν στη νευροδιαβίβαση¹¹.

Οι συνάψεις δημιουργούνται συνήθως μεταξύ των απολήξεων του νευράξονα του προσυναπτικού κυττάρου και των δενδριτών του μετασυναπτικού κυττάρου. Παρά το γεγονός ότι οι περισσότερες συνάψεις είναι χημικές, στη νευρική λειτουργία υπάρχουν συνάψεις που λειτουργούν με ηλεκτρικό τρόπο. Οι χημικές συνάψεις χρησιμοποιούν για τη μετάδοση του σήματος χημικές ουσίες που ονομάζονται νευροδιαβιβαστές, ενώ στις ηλεκτρικές συνάψεις ο παράγοντας διαβίβασης είναι το ιοντικό ρεύμα, που μεταφέρεται μέσω ειδικών διαύλων ιόντων, που ονομάζονται διάυλοι χασματοσυνδέσεων (**Εικόνα 13**). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στις ηλεκτρικές συνάψεις είναι σχεδόν μηδενική η καθυστέρηση μετάδοσης του σήματος στη σύναψη, ενώ η φορά διαβίβασης είναι συνήθως αμφίδρομη (5).

Στις χημικές συνάψεις δεν υπάρχει φυσική συνέχεια ή επαφή του προσυναπτικού με το μετασυναπτικό κύτταρο, αλλά χωρίζονται με ένα μικρό διάστημα (~20-40nm) που

¹¹http://bcs.whfreeman.com/webpub/Ektron/Hillis%20Principles%20of%20Life2e/Animated%20Tutorials/pol2e_at_3404_neurons_and_synapses/pol2e_at_3404_neurons_and_synapses.html?fbclid=IwAR2Tt_51C7Pmdm35c_jC42Ldch88FHCMlh839sY6_A9vHObDQCvgWIP9AdOc

ονομάζεται συναπτική σχισμή. Οι απολήξεις του νευράξονα του προσυναπτικού νευρώνα περιέχουν κυστίδια, καθένα από τα οποία περικλείει χιλιάδες μόρια νευροδιαβιβαστή. Κάθε νευρικό κύτταρο περιέχει έναν βασικό νευροδιαβιβαστή, και κάποιες φορές μπορεί να περιέχει και μέχρι τρεις επικουρικούς (7).



Εικόνα 13. Αναπαράσταση μιας ηλεκτρικής σύναψης¹².

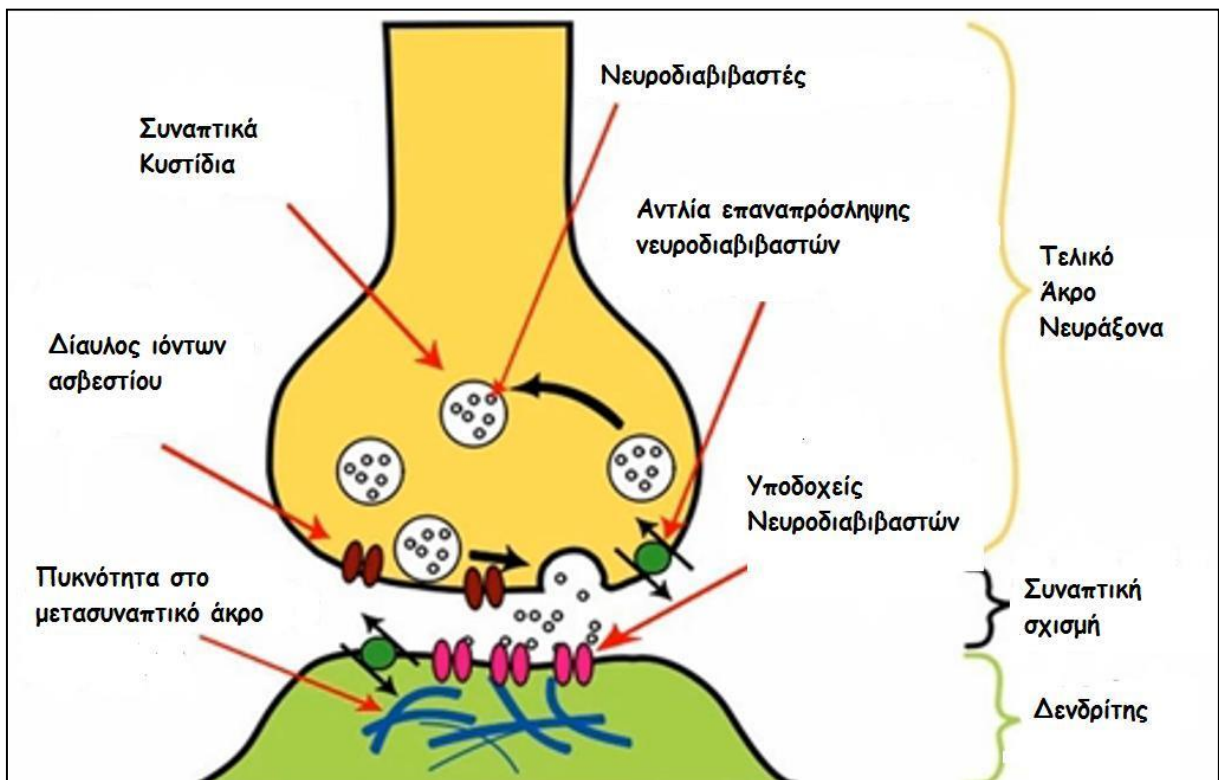
Το δυναμικό ενέργειας που διαβιβάζεται κατά μήκος του νευράξονα ευνοεί την απελευθέρωση ασβεστίου (Ca^{2+}) μέσω του ανοίγματος τασεοελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου, το οποίο ακολούθως προκαλεί την συγχώνευση των κυστιδίων με τη μεμβράνη του προσυναπτικού κυττάρου και την απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών στο συναπτικό χάσμα (**Εικόνα 14**). Ακολούθως, τα μόρια του νευροδιαβιβαστή που βρίσκονται στο συναπτικό χάσμα προσδένονται σε κατάλληλους υποδοχείς του μετασυναπτικού κυττάρου, οι οποίοι εν συνεχεία οδηγούν στο άνοιγμα ή κλείσιμο διαύλων ιόντων και την αλλαγή της κατάστασης του κυττάρου.

Συνοψίζοντας τη διαδικασία της νευροδιαβίβασης, αξίζει να σημειώσουμε τις εξής παρατηρήσεις:

¹²https://www.researchgate.net/figure/Representation-of-an-electrical-synapse-91_fig2_289479733

α) η πολυπλοκότητα της διαδικασίας της χημικής διαβίβασης προκαλεί μια καθυστέρηση διάδοσης του σήματος από τα 0,3ms έως και πάνω από τα 1,5ms, σε αντίθεση με την ηλεκτρική διαβίβαση που είναι σχεδόν ακαριαία, όπως αναφέραμε και προηγουμένως.

β) οι ποικίλες διαδικασίες που περιγράψαμε και που λαμβάνουν χώρα στην χημική διαβίβαση, διακρίνονται από τη δυνατότητα πλαστικότητας, δηλαδή τροποποίησης των μηχανισμών της μεταφοράς πληροφορίας. Μια μακροπρόθεσμη τροποποίηση των νευροδιαβιβαστών που περιέχονται στα συναπτικά κυστίδια και απελευθερώνονται, ή μια μεταβολή στην ποσότητα του ασβεστίου που συγκεντρώνεται, και που επηρεάζει την ποσότητα νευροδιαβιβαστή που απελευθερώνεται, είναι παραδείγματα πλαστικότητας διαδικασιών κρίσιμων στις λειτουργίες του εγκεφάλου (7).



Εικόνα 14. Αναπαράσταση της νευροδιαβίβασης σε μια χημική σύναψη¹³.

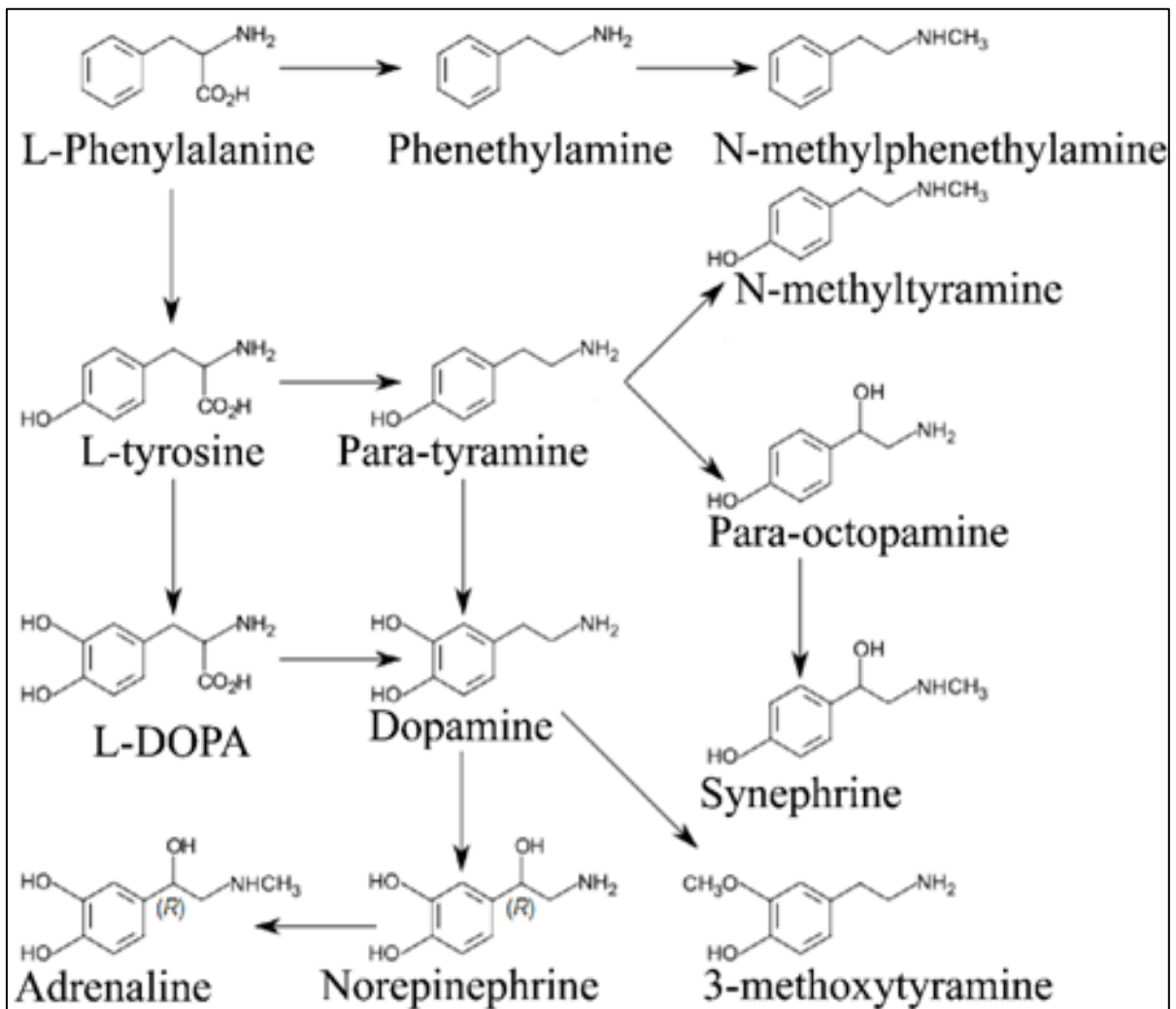
¹³<https://antonislazaris68.files.wordpress.com/2013/10/cebdcceb5cf85cf81cebfcceb4ceb9ceb2ceb9ceb2ceb1cf83cf84ceadc82.jpg?fbclid=IwAR0H8koYPluyjpS98dswv40XU6wZSMCrXfuHFLFPyJ8bcQGmOLzsaMuLhAQ>

2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2-ΟΙ ΜΟΝΟΑΜΙΝΕΣ

Οι μονοαμίνες ήταν άγνωστες μέχρι τα τέλη του 19^{ου} αιώνα, αφού πρώτη φορά ανακαλύφθηκαν στις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Παρόλα αυτά, η παρουσία τους στον εγκέφαλο παρέμενε άγνωστη μέχρι τα μέσα του 20^{ου} αιώνα, όταν αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στην εργασία των *Vogt et al.* (1954) (8, 9). Οι νευροδιαβιβαστές είναι μονοαμίνες, μικρά μόρια, που λειτουργούν σαν νευρομετατροπείς και αποτελούνται από μια αμινομάδα συνδεδεμένη σε ένα αρωματικό δακτύλιο προσδεδεμένο με μια δικαρβονική αλυσίδα (-CH₂-CH₂-). Οι μονοαμίνες, προκύπτουν από τα αρωματικά αμινοξέα, όπως η φενυλαλανίνη, η τυροσίνη, η τρυπτοφάνη και οι ορμόνες του θυρεοειδούς. Η σύνθεση των μονοαμινών, καταλύεται από τη δράση ειδικών ενζύμων, όπως είναι οι αποκαρβοξυλάσες (*decarboxylases*) (**Εικόνα 15**). Παραδείγματα μονοαμινών που ανακαλύφθηκαν στα μέσα του 20^{ου} αιώνα είναι η ντοπαμίνη, που απομονώθηκε το 1957, και η σεροτονίνη, που απομονώθηκε το 1948. Και οι δύο αυτές μονοαμίνες εντοπίστηκαν αργότερα στον εγκέφαλο και αυτό σηματοδότησε τη μελέτη του ρόλου τους στην ομοιόσταση και τη φυσιολογία του εγκεφάλου. Στη συνέχεια αυτών των ερευνών, βρέθηκαν τα μονοαμινεργικά συστήματα, δηλαδή τα νευρωνικά δίκτυα που χρησιμοποιούν μονοαμίνες (νευροδιαβιβαστές) και που εμπλέκονται στη ρύθμιση των γνωστικών διαδικασιών, όπως το συναίσθημα και συγκεκριμένοι τύποι μνήμης. Έχει αποδειχθεί ότι οι μονοαμίνες παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην έκκριση και την παραγωγή της νευροτροφίνης-3 από τα αστροκύτταρα, μία χημική ουσία που διατηρεί την ακεραιότητα των νευρώνων και παρέχει στους νευρώνες τροφική υποστήριξη (2). Φάρμακα τα οποία αυξάνουν (ή μειώνουν) τις επιδράσεις των μονοαμινών χρησιμοποιούνται πολλές φορές για να θεραπεύσουν ασθενείς με ψυχιατρικές διαταραχές, όπως κατάθλιψη, άγχος και σχιζοφρένεια (1). Ακόμα όμως η μελέτη και η εκτίμηση των μονοαμινών παραμένει μια δύσκολη αποστολή από την στιγμή που οι πιο χρήσιμοι και βαρυσήμαντοι τρόποι έρευνας των μονοαμινών είναι τα πειράματα *in vivo*. Άλλες μεθοδολογίες για την εκτίμηση των μονοαμινών στερούνταν το πλεονέκτημα της έρευνας σε πραγματικό χρόνο, το οποίο είναι απαραίτητο για την εκτίμηση του ρόλου των μονοαμινών στη φυσιολογία του ΚΝΣ.

2.1. Εισαγωγή στις Ηλεκτροχημικά Ενεργές Μονοαμίνες

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών, η διεγερτική διαβίβαση είναι με διαφορά η πιο συχνά υλοποιήσιμη από τις χημικές συνάψεις. Άλλοι μηχανισμοί μετάδοσης σήματος (π.χ. ηλεκτρικές συνάψεις) διατηρούν έναν υποδεέστερο ρόλο. Ένας νευροδιαβιβαστής που έχει συντεθεί στον προσυναπτικό νευρώνα απελευθερώνεται από τα ακρότατα σημεία του άξονα του νευρώνα, μέσω των συναπτικών κυστιδίων (10).



Εικόνα 15. Βιοσύνθεση των μονοαμινών ντοπαμίνη και αδρεναλίνη¹⁴.

Στη συνέχεια συγγέεται με τους μετασυναπτικούς υποδοχείς του κυττάρου-δέκτη και πυροδοτεί συγκεκριμένες αντιδράσεις, όπως η αλλαγή της αγωγιμότητας για κάποια ιόντα. Οι συνάψεις μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες. Τα νευρωνικά συστήματα μπορούν να διαιρεθούν με βάση το νευροδιαβιβαστή που παράγουν. Έτσι έχουμε το ακετυλοχολινεργικό (ACh) σύστημα και το μονοαμινεργικό σύστημα, το οποίο περιέχει συνάψεις που απελευθερώνουν μονοαμίνες ή βιογενείς αμίνες. Οι τελευταίες είναι μικρά μόρια που περιέχουν μια αμινομάδα (-NH₃). Το μονοαμινεργικό σύστημα μπορεί να διαιρεθεί σε μικρότερες ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τις κατεχολαμίνες, που περιλαμβάνουν την ντοπαμίνη (DA), την αδρεναλίνη (A), επίσης γνωστή ως επινεφρίνη (E), και τη νοραδρεναλίνη (NA), γνωστή και ως νορεπινεφρίνη (NE). Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τη σεροτονίνη, γνωστή και ως 5-υδροξυτρυπταμίνη (5-HT) και την ισταμίνη (10).

¹⁴https://en.wikipedia.org/wiki/Monoamine_neurotransmitter

Βασισμένα στους προαναφερόμενους νευροδιαβιβαστές, τα νευρωνικά κύτταρα περιλαμβάνουν τις αδρενεργικές συνάψεις, από τις οποίες απελευθερώνεται η νορεπινεφρίνη ή η αδρεναλίνη. Ο νευροδιαβιβαστής που απαντάται πιο συχνά στο νευρικό σύστημα είναι η νορεπινεφρίνη, χρησιμοποιούμενη στα γαγγλιακά κύτταρα και στο συμπαθητικό νευρικό σύστημα. Η βιοσύνθεση των κατεχολαμινών ξεκινά από το ένζυμο τυροσίνη (Tyr). Η τυροσίνη απορροφάται από τα νευρικά κύτταρα μέσω του κυκλοφορικού, πράγμα που σημαίνει ότι αυτό το ένζυμο μπορεί να διασχίσει το επονομαζόμενο φράγμα αίματος-εγκεφάλου (Blood Brain Barrier/BBB). Η τυροσίνη αποθηκεύεται στα συναπτικά κυστίδια και καταλύεται σε 5-διυδροξυφαινυλαλανίνη (DOPA). Η DOPA καταλύεται περαιτέρω από το ένζυμο υδροξυλάση της τυροσίνης και σχηματίζει τη ντοπαμίνη (DA). Η ντοπαμίνη καταλύεται σε νοραδρεναλίνη από το ένζυμο DOPA-decarboxylase. Η DA υποβιβάζεται από το ένζυμο μονοαμινο-οξειδάση (MAO) για να παρέχει την πρώτη ύλη για την έναρξη του μεταβολικού μονοπατιού από την αρχή. Ένα από τα σημαντικά σκαλοπάτια στο μεταβολικό μονοπάτι είναι η κατάλυση της ντοπαμίνης σε διυδροξυ-φαινυλ-οξικό οξύ (DOPAC) μέσω της MAO. Η προαναφερθείσα καταλυτική διαδικασία είναι κρίσιμη επειδή το DOPAC είναι μόριο που μπορεί να οξειδωθεί και να ανιχνευθεί μέσω βολταμμετρικών τεχνικών, άρα έμμεσα μπορεί να μας δώσει μια εκτίμηση των επιπέδων ντοπαμίνης.

Ένα άλλο σημαντικό μόριο είναι ο νευροδιαβιβαστής σεροτονίνη. Η σεροτονίνη απελευθερώνεται στους σεροτονινεργικούς νευρώνες και αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά μονοπάτια μεταγωγής σημάτων. Η σεροτονίνη διαφέρει από τις κατεχολαμίνες επειδή κατέχει ένα δακτύλιο ινδόλης, ο οποίος φέρει ένα αλκύλιο καθώς και ένα κατεχολικό δακτύλιο. Το αλκύλιο περιέχει μια αμινομάδα, που καθιστά τη σεροτονίνη μονοαμινεργική. Οι μονοαμινεργικοί νευρώνες σεροτονίνης βρίσκονται κυρίως στο εγκεφαλικό στέλεχος και στην παρεγκεφαλίτιδα. Παράλληλα, οι νευρώνες που απελευθερώνουν ντοπαμίνη βρίσκονται και αυτοί κυρίως στο εγκεφαλικό στέλεχος, αλλά και στον μεσεγκέφαλο (10). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ντοπαμίνης έχουν ανιχνευθεί στον εγκέφαλο και ειδικότερα στις ανατομικές δομές *Tubus Olfactorius*, *Nucleus Accumbens* και στο ραβδωτό σώμα. Μια μικρότερη ομάδα ντοπαμινεργικών νευρώνων εντοπίζεται στον υποθάλαμο και ανήκει στο *Tuberoinfundibular-Hypophyseal system*.

Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες εντοπίζονται επιπλέον στον κοιλιακό μεσεγκέφαλο (*Ventral Mesencephalon*) και διαχωρίζονται περαιτέρω σε μια υποομάδα, η οποία βρίσκεται στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο (*Ventral Tegmentum and cells*) και στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (*Substantia Nigra Pars Compacta*) (SNC)). Οι νευρώνες στην περιοχή του

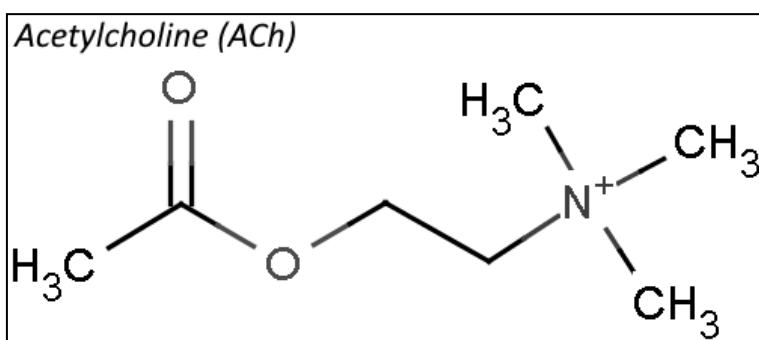
καλυπτρικού κοιλιακού πεδίου (*Ventral Tegmentum*) νευρώνουν τον πρόσθιο φλοιό μέσω του μεσολιμβικού συστήματος (*mesolimbic system*) και ειδικότερα τον επικλινή πυρήνα (*Nucleus Accumbens*). Οι νευρώνες της SNC νευρώνουν το ραβδωτό σώμα, όπως επίσης και το μεσεγκεφαλικό τετράδυμο πέταλο (*Tectum*) και το θάλαμο (*Thalamus*) όπου περισσότεροι από το 95% των νευρώνων ανήκουν σε ντοπαμινεργικό μονοπάτι.

2.2. Άλλοι Νευροδιαβιβαστές

Εκτός από τις βιογενείς αμίνες που περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, υπάρχουν και άλλες μοριακές ουσίες που λειτουργούν ως χημικοί νευροδιαβιβαστές. Από αυτές, η ακετυλοχολίνη (ACh), το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), το γλουταμινικό οξύ και η γλυκίνη είναι επίσης αμίνες, ενώ αναφέρεται και η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) (5).

2.2.1. Ακετυλοχολίνη

Η σύνθεση της ακετυλοχολίνης προκαλείται από την αντίδραση της χολίνης με το ακετυλοσυνένζυμο Α (CoA), η οποία καταλύεται ακολούθως από το ένζυμο χολινοακετυλοτρανφεράση (**Εικόνα 16**).



Εικόνα 16. Χημική δομή της ακετυλοχολίνης¹⁵.

Η ακετυλοχολίνη διαβιβάζει σήματα στο αυτόνομο νευρικό σύστημα, και συγκεκριμένα συνδέεται με τη γαγγλιακή διαβίβαση και τη νευρομυϊκή διαβίβαση. Επίσης συνδέεται στους μουςκαρινικούς και στους νικοτινικούς υποδοχείς του εγκεφάλου. Ανταγωνιστές που χρησιμοποιούνται στο ακετυλοχολινεργικό σύστημα συμβάλλουν στη θεραπεία της νόσου Parkinson, αποκαθιστώντας τη διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ ντοπαμινεργικής και ακετυλοχολινεργικής νευροδιαβίβασης (11).

¹⁵<http://psychiatricdrugs.com/wp-content/uploads/2015/12/Acetylcholine-structure.png>

2.2.2. Λοιπά Αμινοξέα

Σε αντίθεση με τις μονοαμίνες και την ακετυλοχολίνη, υπάρχει μια ομάδα αμινοξέων, η γλυκίνη, το γλουταμινικό οξύ και το GABA, που είναι κοινά πρωτεϊνικά συστατικά και λειτουργούν ως νευροδιαβιβαστές. Η γλυκίνη συντίθεται από σερίνη, και διαβιβάζει σήματα στους διάμεσους ανασταλτικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού. Το GABA συντίθεται από το γλουταμινικό οξύ, μετά την κατάλυση από το ένζυμο αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού οξέος. Το GABA είναι ο μείζων ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Ουσίες που διεγείρουν τη δράση του GABA (π.χ. βαρβιτουρικά, βενζοδιαζεπίνες, κ.α.), χρησιμοποιούνται ως μυοχαλαρωτικά ή ηρεμιστικά για την αντιμετώπιση των σπασμών, του άγχους, κ.λπ. (11). Το γλουταμινικό οξύ, που είναι διεγερτικός νευροδιαβιβαστής, θεωρείται αποφασιστικής σημασίας σε θεμελιώδεις διεργασίες του εγκεφάλου, όπως η μάθηση και η μνήμη, ενώ λειτουργικές του ανεπάρκειες συνδέονται με τη νόσο Alzheimer και τη νόσο Huntington (11).

3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3-ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ

Η έρευνα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) έχει τις απαρχές της στην αυγή του 19^{ου} αιώνα. Οι πρώτες απόπειρες αφορούσαν τις ανακαλύψεις των μορφολογικών και ανατομικών χαρακτηριστικών του ΚΝΣ, παρά το γεγονός ότι είχαν προηγηθεί κατά έναν αιώνα έρευνες σχετικές με την ηλεκτρική φύση του νευρικού συστήματος, χάρη στις προσπάθειες του *Luigi Galvani*. Επιπλέον, στα μέσα του 20^{ου} αιώνα (1924), η ανακάλυψη της πολαρογραφίας, από τον *Jaroslav Heyrovský*, άνοιξε νέες προοπτικές στην έρευνα της φυσιολογίας του ΚΝΣ (**Εικόνα 17**). Πιο συγκεκριμένα, η ανακάλυψη του *Heyrovský* αφορούσε στην ιδιότητα ορισμένων ηλεκτροδίων να οξειδώνουν μόρια που εκδήλωναν μια τάση οξειδωσης. Με αυτή τη μέθοδο είναι δυνατό να εκτιμήσεις την παρουσία συγκεκριμένων μορίων ή στοιχείων σε ένα διάλυμα και σε μερικές περιπτώσεις την ποσότητά τους. Ο *Heyrovský* διαμόρφωσε τον πρόδρομο της βολταμμετρικής μεθόδου στα 1924, χρησιμοποιώντας ένα ηλεκτρόδιο υδραργύρου και συμπεραίνοντας ότι το μετρούμενο ρεύμα από το ηλεκτρόδιο, όταν εφαρμόζεται μια τάση, παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη συγκέντρωση των ουσιών στο διάλυμα που έχουν την ιδιότητα να οξειδώνονται (12). Αργότερα, η ίδια ιδέα εφαρμόστηκε σε ηλεκτρόδια άνθρακα ή άλλου τύπου, και αποτέλεσε την βολταμμετρία (13). Αυτές οι ανακαλύψεις άνοιξαν νέες πειραματικές δυνατότητες, όπως οι *in vivo* και *in vitro* ηλεκτροχημικές τεχνικές που θα επέτρεπαν τη μέτρηση βιολογικών ουσιών ή μορίων σε περιοχές του άθικτου ζωντανού εγκεφάλου των ζώων (14).



Εικόνα 17. Ο πολαρογράφος του *Heyrovský*¹⁶.

¹⁶ https://en.wikipedia.org/wiki/Polarography#/media/File:Heyrovsk%C3%A9ho_polarograf_2.jpg

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '70, εισάγεται μια ηλεκτροχημική τεχνική που προοριζόταν στο να υπερκεράσει τις δυσκολίες, με το όνομα βολταμμετρία (14, 15). Η βολταμμετρία βασίστηκε στην ηλεκτροχημική ιδιότητα των βιολογικών υγρών, και ειδικότερα κάποιων μορίων όπως οι νευροδιαβιβαστές και οι μεταβολίτες τους (φαινόλες, θιόλες, κλπ.) να οξειδώνονται όταν έρθουν σε απειροστά μικρή απόσταση με μεταλλική ή ημιαγώγιμη επιφάνεια¹⁷ (14, 16, 17). Η βολταμμετρική μέθοδος αποδείχθηκε ότι διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα, όπως ικανοποιητική χρονική (της τάξης των ms) και χωρική ανάλυση, χημική ταυτοποίηση των υπό μελέτη ουσιών, μικρή διαταραχή των περιοχών του εγκεφάλου, αντιστοίχιση μεταξύ των χημικών αποτελεσμάτων και των συμπεριφορικών παραμέτρων, κλπ. (17-19). Η βολταμμετρία έχει εξελιχθεί και έχει αναπτυχθεί μια μεγάλη ποικιλία τεχνικών. Κάποιες από αυτές είναι η κυκλική βολταμμετρία, η διαφορική βολταμμετρία (Differential Pulse Voltammetry (DPV)), η υδροδυναμική βολταμμετρία, *stripping voltammetry*, η αμπερομετρία, και άλλες. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το βασικό πλεονέκτημα της βολταμμετρίας ήταν το γεγονός ότι επέτρεπε *in vivo* μετρήσεις, παρά τον περιορισμό της σε δύο σημαντικά χαρακτηριστικά, την ευαισθησία και την επιλεξιμότητα. Επιπροσθέτως, είχε αναπτυχθεί και ένας αριθμός άλλων τεχνικών για τη μελέτη της φυσιολογίας του ΚΝΣ. Πολλές από αυτές (cortical cup, push-pull cannula, μικροδιάλυση) παρουσίαζαν τη δυνατότητα να μετρούν τα επίπεδα μονοαμινών σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα. Αυτές οι μέθοδοι παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία, αλλά έχουν το μειονέκτημα ότι προκαλούν υπερβολική ζημιά στον εγκεφαλικό ιστό και υλοποιούν ανακριβείς μετρήσεις των υπό μελέτη ουσιών (13, 14, 20).

Καταληκτικά, όλες οι προαναφερθείσες μεθοδολογίες έχουν βρει εφαρμογή σε μια ευρεία ποικιλία επιστημονικών ερευνών και προσπαθειών, όπως είναι η μελέτη της φυσιολογίας των νευροδιαβιβαστών, που είναι κρίσιμη, λόγω της σχέσης της με τις νευρικές και ψυχικές διαταραχές (κατάθλιψη, άγχος, παχυσαρκία, κλπ.) (21-24).

3.1. Στοιχεία Ηλεκτροχημείας

Η ηλεκτροχημεία θα μπορούσε να οριστεί ως ο τομέας που μελετά την αλληλεπίδραση μεταξύ της ηλεκτρικής ενέργειας και της χημικής δαπάνης. Όταν μια χημική αντίδραση προκαλείται από ένα εξωτερικά παρεχόμενο ρεύμα, όπως στην ηλεκτρόλυση, τότε αυτή ονομάζεται ηλεκτροχημική αντίδραση. Μια βασική κατηγορία ηλεκτροχημικών φαινομένων είναι οι αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής. Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις αναφέρονται

¹⁷Οι Hochstetler SE & Wightman RM (1998) εκτιμούν αυτή την απόσταση σε λίγα άنگκστρομ, για τις βολταμμετρικές τεχνικές.

σε μια ηλεκτροχημική διαδικασία, όπου η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από ή προς ένα μόριο ή ιόν, μεταβάλλει την κατάσταση οξειδώσής του. Αυτές οι αντιδράσεις συμβαίνουν αυθόρμητα ή μετά την εφαρμογή μιας εξωτερικής τάσης. Σε συνέχεια των προηγουμένων, ορίζουμε το ηλεκτροχημικό κύτταρο ως μια συσκευή που παράγει ηλεκτρικό ρεύμα από ενέργεια που απελευθερώνεται μέσω μιας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης. Παραδείγματα ηλεκτροχημικών κελιών περιλαμβάνουν συσκευές όπως τα γαλβανικά ή βολταϊκά κύτταρα, καθώς και τα βολταμετρικά κύτταρα. Τα ηλεκτροχημικά κύτταρα περιλαμβάνουν δύο αγώγιμα ηλεκτρόδια, ανόδου και καθόδου, όπου το ηλεκτρόδιο ανόδου προκαλεί οξείδωση και το ηλεκτρόδιο καθόδου προκαλεί αναγωγή. Κρίσιμο συστατικό του ηλεκτροχημικού κυττάρου είναι ένα διάλυμα που διευκολύνει τη ροή του ρεύματος, και που ονομάζεται ηλεκτρολύτης. Οι ηλεκτρολύτες είναι συνήθως ρυθμισμένα διαλύματα, τα οποία χρησιμοποιούνται και ως διαλυτικά μέσα για άλλες ουσίες που πρόκειται να εκτιμηθούν. Στην περίπτωση των βολταμετρικών κυττάρων προστίθεται ένα ακόμα ηλεκτρόδιο, το οποίο αποτελεί το ηλεκτρόδιο αναφοράς. Δύο κύριες εξισώσεις συγκροτούν την αρχή της ηλεκτροχημείας. Η πρώτη είναι η εξίσωση *Nernst*, η οποία μπορεί να ταυτοποιήσει τη συγκέντρωση των αντιδρώντων σε μια ηλεκτροχημική κυψέλη. Η εξίσωση αυτή εκφράζεται ως:

$$E = E_0 - \frac{RT}{zF} \ln Q_r \quad (3)$$

Ειδικότερα, $E = E_0 - \frac{RT}{zF} \ln Q_r$ (**Εξίσωση 3**), όπου E είναι το δυναμικό του κυττάρου σε θερμοκρασία T , E_0 είναι το δυναμικό ηρεμίας του κυττάρου, R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων, z είναι ο αριθμός των moles ή των ηλεκτρονίων που μεταφέρονται λόγω της αντίδρασης, F είναι η σταθερά Faraday και Q_r είναι ο λόγος της συγκέντρωσης των ουσιών που υφίστανται οξείδωση ($[S_{ox}]$) προς τη συγκέντρωση των ουσιών που υφίστανται αναγωγή ($[S_{red}]$).

Η δεύτερη εξίσωση είναι η εξίσωση *Gibbs*, η οποία προβλέπει αν μια αντίδραση μπορεί να συμβεί αυθόρμητα βασισμένη στην ελεύθερη ενέργεια. Η εξίσωση *Gibbs* σχηματίζεται ως εξής:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln Q \quad (4)$$

Ειδικότερα, $\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln Q$ (**Εξίσωση 4**), όπου ΔG είναι η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια *Gibbs*, ΔG^0 είναι το δυναμικό του κυττάρου όταν $Q=1$, R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων, T είναι η θερμοκρασία και $\ln Q$ είναι ο λόγος των προϊόντων επί των αντιδρώντων.

3.1.1. Οξείδωση

Στην απλούστερη της μορφή, η οξείδωση συμβαίνει όταν ένα μέταλλο βυθίζεται μέσα σε ένα υδατικό διάλυμα. Στη συνέχεια, ιόντα του ηλεκτρολύτη αντιδρούν με την επιφάνεια του μετάλλου και δωρίζουν ηλεκτρόνια σε αυτή (17). Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα αποτελεί η οξείδωση του ασκορβικού οξέος (Ascorbic Acid (AA)) σε Dehydroascorbate (DHA) (13). Η γενικευμένη αντίδραση της οξείδωσης μπορεί να γραφεί ως εξής:



Όπου ne^- είναι ο αριθμός των ηλεκτρονίων που μεταβαίνουν στην επιφάνεια του μετάλλου (17, 25, 26). Η αντίστροφη διαδικασία, όπου ηλεκτρόνια μεταφέρονται στα ιόντα του ηλεκτρολύτη, ονομάζεται αναγωγή (25).

3.1.2. Ηλεκτροκατάλυση

Το φαινόμενο της ηλεκτροκατάλυσης παρουσιάζεται σε ένα διάλυμα με περισσότερες της μίας ουσίες, όταν το ρεύμα οξείδωσης μίας συγκεκριμένης ουσίας ενισχύεται, άρα καταλύεται, από την παρουσία μιας άλλης ουσίας, λόγω επαναληπτικών αντιδράσεων οξείδωσης (17). Για παράδειγμα, στην περίπτωση της ταυτόχρονης παρουσίας ντοπαμίνης (DA) και ασκορβικού οξέος (AA) στο ίδιο διάλυμα, εκδηλώνεται το φαινόμενο της ηλεκτροκατάλυσης. Η ορθοκουϊνίνη (DOQ), που παράγεται από την οξείδωση της ντοπαμίνης, αντιδρά με το ασκορβικό οξύ και παράγει διυδροασκορβικό οξύ (DHA), που είναι το προϊόν οξείδωσης του AA, και ντοπαμίνη (13, 17). Αυτή η διαδικασία περιγράφεται από την αντίδραση που ακολουθεί:



Αυτός είναι ο λόγος που ένα μέρος της ντοπαμίνης δύναται να οξειδωθεί δύο ή περισσότερες φορές και άρα να μετρηθεί παραπάνω φορές, προκαλώντας λανθασμένα αποτελέσματα (13, 17). Αυτό το ρεύμα ηλεκτροκατάλυσης είναι ανεπιθύμητο και μπορεί να μειωθεί εφαρμόζοντας υψηλούς ρυθμούς σάρωσης (όπως στην FSCV) ή με την χρήση σημαντικά μικρών ηλεκτροδίων (13, 17).

3.1.3. Οξειδωτικές Ενώσεις

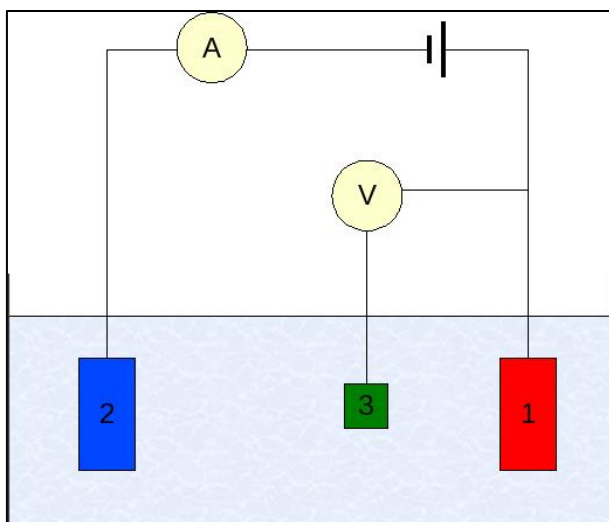
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο λόγος που η βολταμετρία μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα εύρος πειραματικών ερευνών, προέρχεται από το γεγονός ότι πολλές βιοχημικές ουσίες οξειδώνονται (19), με άλλα λόγια μπορούν να παράξουν ένα ρεύμα (ρεύμα *Faraday*) το οποίο είναι εντοπίσιμο και μετρήσιμο. Το ανιχνεύσιμο ρεύμα μιας άγνωστης ουσίας μπορεί να εκτιμηθεί ποσοτικά με την *in vitro* βαθμονόμηση, όπου γνωστές συγκεντρώσεις αντιστοιχίζονται σε μετρούμενα ρεύματα (20). Στην περίπτωση της έρευνας του εγκεφάλου

υπάρχει μια πληθώρα παραδειγμάτων όπου εφαρμόζεται η προηγούμενη μεθοδολογία, όπως λόγου χάρη στην περίπτωση των νευροδιαβιβαστών. Σε μια αναφορά του *Crespi F.* (2011), χρησιμοποιήθηκε η Διαφορική Βολταμμετρία και αναφέρθηκαν διάφορα δυναμικά οξειδωσης για ποικίλους νευροδιαβιβαστές. Για παράδειγμα, σημειώνονται οι τιμές οξειδωσης του νευροπεπτιδίου Υ (NPY) στα 600mV, των κομματιών 13-36 του NPY στα 595mV και του hPP στα 580mV (21). Επίσης, τα μετρούμενα ρεύματα που καταγράφηκαν ήταν 2.8nA για το NPY, 2.4nA για το hPP και 0.46 nA για τα NPY 13-36 (21). Σε μια άλλη εργασία των *Cesruglio et al.* (1981) τα δυναμικά οξειδωσης που ανακαλύφθηκαν περιλαμβάνουν τα -50mV για το AA, 100mV για τις κατεχολαμίνες, 300mV για τις 5-hydroxy ενώσεις (5-HT, 5-HTP, 5-HIAA), 680mV για τα αμινοξέα (τρυπτοφάνη, τυροσίνη) και 680mV μέχρι 800mV για τα νευροπεπτίδια (σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που αναφέρει ο *Crespi F.* (2011)) (19, 21). Επιπλέον, οι *Gonon et al.* (1980), αναφέρουν δυναμικά οξειδωσης στα -50mV για το AA και στα 100mV για το DOPAC στο ραβδωτό σώμα (27), ενώ οι *Clement et al.* (1993) εντόπισαν μια κορυφή τάσης στα 280mV για το 5-HIAA (28). Σημαντικές δυσκολίες φαίνεται να εκδηλώνονται στην ανίχνευση της ισταμίνης, λόγω των ηλεκτροχημικών της ιδιοτήτων. Η ισταμίνη είναι μια αμίνη που οξειδώνεται, αλλά η διαδικασία οξειδωσής της διαφέρει από τις αντίστοιχες της ντοπαμίνης ή της σεροτονίνης, εξαιτίας του γεγονότος ότι προκαλεί μια μετάβαση φορτίου (22). Οι *Samaranayake et al.* (2015) εντόπισαν μια τιμή οξειδωσης, *in vitro* και *in vivo*, περίπου στα 300mV, ενώ οι *Pihel et al.* (1995) ήταν ικανοί να ανιχνεύσουν την ισταμίνη μόνο μετά από κατάλληλη προεπεξεργασία των ηλεκτροδίων (29). Τέλος, σε μια πολύ ενδιαφέρουσα αναφορά των *Kennedy et al.* (1993) θεμελιώνεται μια προσέγγιση για την ανίχνευση της ινσουλίνης (30). Συμπερασματικά, παρά το γεγονός ότι αρκετές μονοαμίνες έχουν εντοπιστεί μέσω ηλεκτροχημικών τεχνικών, υπάρχει ακόμα μία πληθώρα αυτών που δεν έχουν ακόμα ανιχνευθεί, ή τουλάχιστον όχι ικανοποιητικά. Μία εξήγηση για αυτή τη δυσκολία έχει αποδοθεί στους ελλιπείς μετασχηματισμούς της επιφάνειας των ηλεκτροδίων (17).

3.2. Βολταμμετρία

Στη βολταμμετρία, ένα δυναμικό που είναι συνάρτηση του χρόνου, εφαρμόζεται σε μια ηλεκτροχημική κυψέλη, μετρώντας το παραγόμενο ρεύμα σαν συνάρτηση αυτού του δυναμικού. Το παραγόμενο διάγραμμα του ρεύματος σε σχέση με το δυναμικό εισόδου ονομάζεται βολταμμόγραμμα, και είναι το ηλεκτροχημικό ισοδύναμο του φάσματος στη φασματοσκοπία, παρέχοντας ποσοτικές και ποιοτικές πληροφορίες σχετικά με τις ουσίες που συμμετέχουν στις αντιδράσεις οξειδωσης και αναγωγής. Οι πρώιμες βολταμμετρικές μέθοδοι χρησιμοποιούσαν δύο ηλεκτρόδια, ενώ οι επόμενες έκαναν χρήση ενός συστήματος τριών

ηλεκτροδίων (Εικόνα 18). Το χρονικά εξαρτώμενο, διεγερτικό δυναμικό εισόδου εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας, και έτσι μεταβάλλεται η τάση σε σχέση με το σταθερό δυναμικό του ηλεκτροδίου αναφοράς. Αυτό ακολούθως αλλάζει το ρεύμα που ρέει μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του βοηθητικού ηλεκτροδίου. Το βοηθητικό ηλεκτρόδιο είναι συνήθως ένα σύρμα πλατίνας ενώ το ηλεκτρόδιο αναφοράς είναι συνήθως τύπου *Sat'd Calomel* (SCE) (Χλωριούχου Υδραργύρου $Hg/HgCl_2$) ή τύπου χλωριούχου αργύρου ($Ag/AgCl$).



Εικόνα 18. Σύστημα τριών ηλεκτροδίων στη βολταμμετρία. (1) Ηλεκτρόδιο εργασίας, (2) βοηθητικό ηλεκτρόδιο, (3) ηλεκτρόδιο αναφοράς¹⁸.

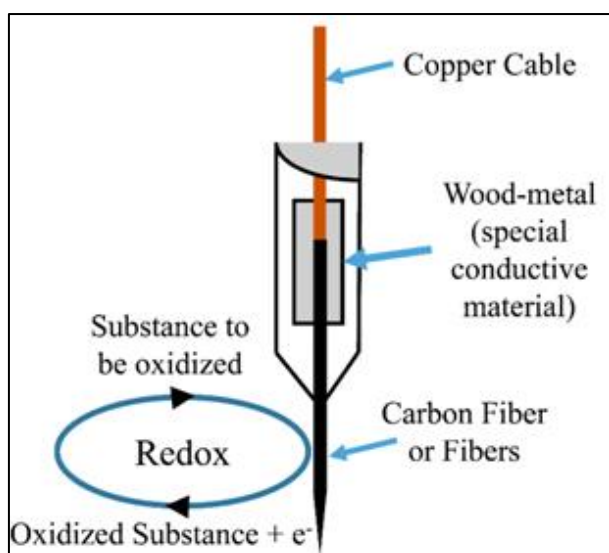
Η περίπτωση του ηλεκτροδίου εργασίας είναι πιο περίπλοκη, αφού μπορεί να κατασκευαστεί από πολλά διαφορετικά υλικά (υδράργυρος, λευκόχρυσος, χρυσός, ασήμι, άνθρακας, κλπ.). Στις πρώτες βολταμμετρικές τεχνικές, όπως και στην πολαρογραφία, χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρόδιο εργασίας από υδράργυρο. Λόγω της ρευστής φύσης του υδραργύρου, το ηλεκτρόδιο εργασίας είναι συχνά μια σταγόνα αποκομμένη από το τέρμα ενός τριχοειδούς σωλήνα. Αυτή είναι η περίπτωση του *Hanging Mercury Drop Electrode* (HMDE) (Εικόνα 19), όπου μια σταγόνα υδραργύρου εξωθείται από την περιστροφή μιας πολύ μικρής βίδας, η οποία σπρώχνει τον υδράργυρο από μία δεξαμενή μέσα σε ένα στενό τριχοειδή σωλήνα. Επιπλέον, στον τύπο ηλεκτροδίου *Dropping Mercury Electrode* (DME), οι σταγόνες υδραργύρου μαζεύονται στο τέλος του τριχοειδούς σωλήνα σαν αποτέλεσμα της βαρύτητας. Σε αντίθεση με το HMDE, η σταγόνα υδραργύρου ενός DME μεγαλώνει συνεχόμενα (καθώς ο υδράργυρος ρέει από τη δεξαμενή κάτω από την επίδραση της βαρύτητας) και έχει έναν πεπερασμένο χρόνο ζωής μερικών δευτερολέπτων. Στο τέλος αυτού του χρόνου ζωής η

¹⁸https://en.wikipedia.org/wiki/Voltammetry#/media/File:Three_electrode_setup.png

σταγόνα υδραργύρου εκτοπίζεται, χειροκίνητα ή από μόνη της, και αντικαθίσταται από μια νέα σταγόνα. Τέλος, υπάρχει ο τύπος ηλεκτροδίου, *Static Mercury Drop Electrode (SMDE)* που χρησιμοποιεί ένα σωληνοειδές έμβολο για τον έλεγχο της ροής του υδραργύρου. Η ενεργοποίηση του σωληνοειδούς σηκώνει στιγμιαία το έμβολο και επιτρέπει στον υδράργυρο να κυλήσει μέσα από τον τριχοειδή σωλήνα και να σχηματίσει μία μοναδική, κρεμαστή σταγόνα υδραργύρου. Η επαναληπτική ενεργοποίηση του σωληνοειδούς παράγει μια σειρά από σταγόνες υδραργύρου. Με αυτό τον τρόπο το SMDE μπορεί να χρησιμοποιηθεί ή ως HMDE είτε ως DME. Αργότερα, στη βολταμμετρία χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρόδια εργασίας από ίνες άνθρακα, ενός νήματος ή πολλαπλών νημάτων (**Εικόνα 20**).



Εικόνα 19. Hanging Mercury Drop Electrode¹⁹.



Εικόνα 20. Μοντέλο του βολταμμετρικού ηλεκτροδίου και η αντίστοιχη οξειδοαναγωγική αντίδραση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου άνθρακα (από: *Theodoridis & Lambrou (2019)*) (31).

¹⁹https://en.wikipedia.org/wiki/Hanging_mercury_drop_electrode#/media/File:HangingMercuryDropElectrode.JPG

3.2.1. Βολταμετρικές Τεχνικές

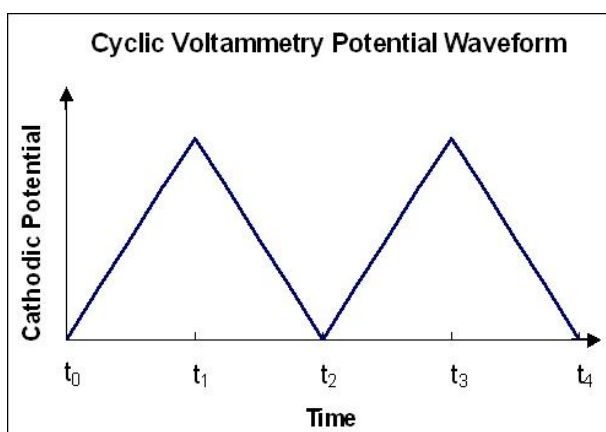
Τροποποιήσεις της βολταμετρικής μεθοδολογίας βασίζονται στις ποικίλες μεταβολές της τάσης εισόδου που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας (14). Κάθε μία από αυτές τις παραλλαγές, διαφέρει σε σημαντικά χαρακτηριστικά, όπως είναι η χρονική ανάλυση, η ευαισθησία, και η δυνατότητα χημικής ταυτοποίησης των εντοπιζόμενων στοιχείων (14). Αρκετές από τις υπάρχουσες βολταμετρικές μεθοδολογίες παρουσιάζονται παρακάτω.

3.2.1.1. Αμπερομετρία

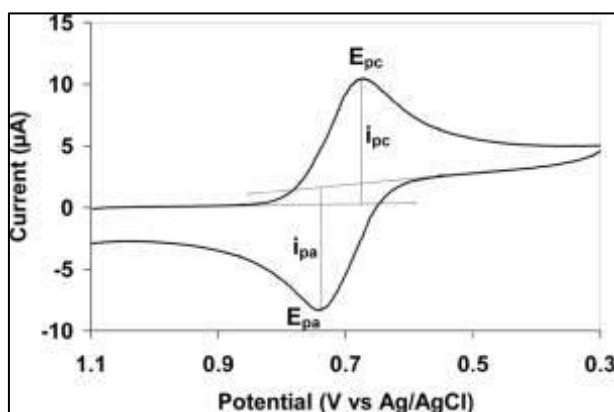
Στην αμπερομετρία, εφαρμόζεται ένα δυναμικό στο ηλεκτρόδιο εργασίας το οποίο διατηρείται σταθερό και αρκούντως θετικό έτσι ώστε να προκαλέσει οξείδωση των υπό μελέτη ουσιών (13, 17, 20). Το ρεύμα εξόδου μετράται σε συνάρτηση με τον χρόνο (15, 17). Το σταθερό δυναμικό εισόδου προκαλεί μειωμένη χωρητικότητα στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου-διαλύματος, και άρα, χαμηλότερο θόρυβο (17), καθώς επίσης και ικανοποιητικό λόγο ρεύματος Faraday προς ρεύμα φόρτωσης (13, 15). Η αμπερομετρία εκδηλώνει επίσης ικανοποιητική χρονική ανάλυση (υπό της κλίμακας των millisecond (17, 20, 32)) για γρήγορες μετρήσεις (μεταβολές στη συγκέντρωση των νευροδιαβιβαστών, απελευθέρωση, κλπ. (15, 20)). Οι Adams *et al.* (2008) ισχυρίζονται ότι, όταν η αμπερομετρία εφαρμόζεται σε ένα συμβάν απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή, το σχήμα του γραφήματος που προκύπτει παρέχει αρκετές πληροφορίες σχετικά με τις συνθήκες του συμβάντος (33), έχει όμως επίσης αναφερθεί ότι η αμπερομετρία δεν μπορεί να υλοποιήσει χημική ταυτοποίηση της ουσίας που εντοπίζεται σε ένα διάλυμα (13-15, 17, 20, 32).

3.2.1.2. Κυκλική Βολταμετρία

Στην κυκλική βολταμετρία, εφαρμόζεται μία αύξουσα τάση με μορφή ράμπας (13), και το ρεύμα οξείδωσης προκύπτει από την στιγμή που το δυναμικό του ηλεκτροδίου φτάνει να ταυτίζεται με τα κατάλληλα δυναμικά οξείδωσης των ουσιών (**Εικόνα 21**) (13). Πριν από αυτή την στιγμή, μετράται μόνο το ρεύμα φόρτισης. Ακολούθως, εφαρμόζεται μια αρνητική σάρωση, όπου επισυμβαίνει η αναγωγή των ουσιών που προηγουμένως είχαν οξειδωθεί (**Εικόνα 22**) (15, 17). Οι Kawagoe *et al.* (1993) ανέφεραν ότι το προϊόν της οξείδωσης μπορεί να υποστεί διάχυση, με αποτέλεσμα οι ουσίες που υφίστανται αναγωγή στην καθοδική σάρωση να υποεκτιμηθούν (15). Κρίσιμη δυνατότητα της κυκλικής βολταμετρίας, όπως και των υπόλοιπων τεχνικών που περιγράφονται παρακάτω (FSCV, DPV, etc.) είναι η παροχή χημικής ταυτοποίησης των ουσιών που υφίστανται οξείδωση (13, 14, 17).



Εικόνα 21. Το δυναμικό εισόδου στην κυκλική βολταμμετρία αυξάνει σαν ράμπα γραμμικά σε κυκλικές φάσεις²⁰.



Εικόνα 22. Κυκλική βολταμμετρία²¹.

3.2.1.3. Fast Scan Cyclic Voltammetry (FSCV)

Το εφαρμοζόμενο δυναμικό είναι μια τριγωνική κυματομορφή (17). Η FSCV χρησιμοποιείται κυρίως στη μελέτη της ισταμίνης (22), της σεροτονίνης (20, 23, 33, 34) και της ντοπαμίνης (20, 32, 35, 36), όπως επίσης εφαρμόζεται στον εντοπισμό της απελευθέρωσης και της πρόσληψης των κατεχολαμινών στα χρωμοφόρα κύτταρα (37). Η FSCV παρουσιάζει τη δυνατότητα του εντοπισμού της συγκέντρωσης μονοαμινών στο εύρος των nM-µM (20, 36).

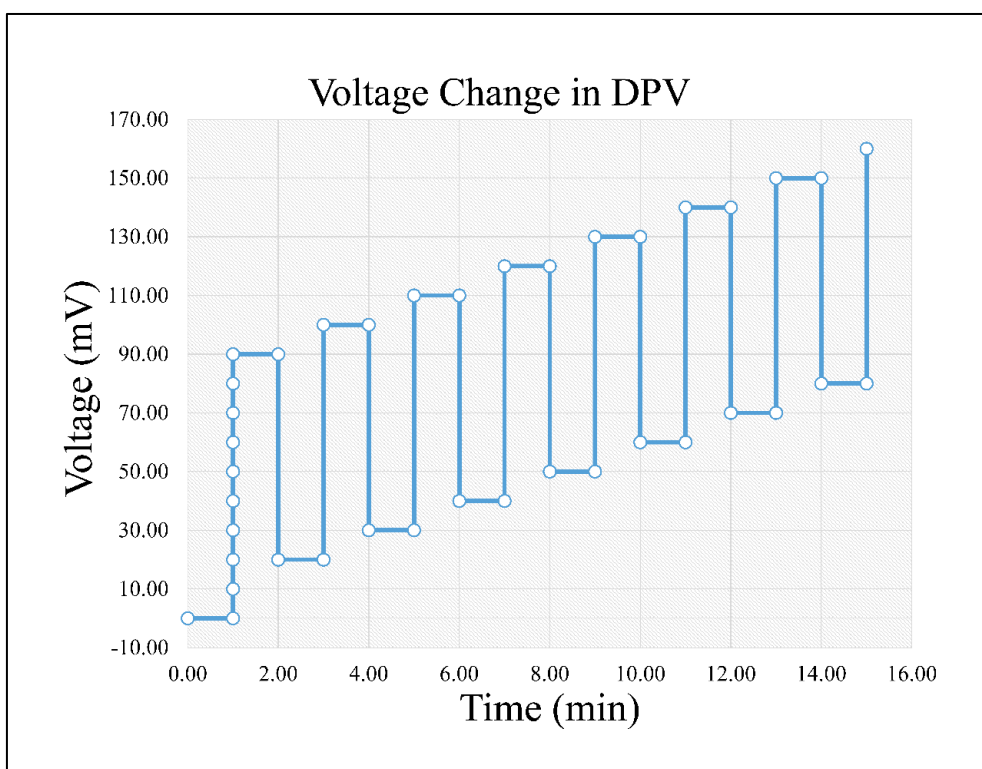
3.2.1.4. Differential Pulse Voltammetry (DPV)

Η Διαφορική Βολταμμετρία αποτελείται από έναν συνδυασμό της αμπερομετρίας και της κυκλικής βολταμμετρίας (13-15, 19). Έτσι, η τεχνική αυτή συνδυάζει το πλεονέκτημα της αμπερομετρίας για μειωμένο ρεύμα φόρτισης, μαζί με υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία,

²⁰https://en.wikipedia.org/wiki/Cyclic_voltammetry#/media/File:Cyclicvoltammetrywaveform.jpg

²¹https://en.wikipedia.org/wiki/Cyclic_voltammetry#/media/File:Cyclovoltammogram.jpg

καθώς επίσης και χημική ταυτοποίηση (13, 15, 21, 38). Παρόλα αυτά, στερείται στην χρονική ανάλυση (15) (για την καταστολή του ρεύματος φόρτισης απαιτούνται χαμηλοί ρυθμοί σάρωσης). Η εφαρμοζόμενη τάση αποτελείται από μια σειρά από χρονικά εξαρτώμενα και διαρκώς αυξανόμενα δυναμικά (**Εικόνα 23**). Από τη μορφή της τάσης εισόδου προκύπτει ένα σημαντικό χαρακτηριστικό, ότι το μετρούμενο ρεύμα στην DPV είναι η διαφορά μεταξύ των ρευμάτων στην αρχή και στο τέλος του κάθε παλμού (15, 19). Ο *Crespi F.* (2011) εφάρμοσε την διαφορική βολταμμετρία στην αμυγδαλή των ποντικών με σκοπό να μελετήσει τις δραστηριότητες του νευροπεπτιδίου Y (NPY) και των υποδοχέων του (21). Επιπλέον, οι *Clement et al.* (1993) μέτρησαν σεροτονίνη και 5-HIAA στην περιοχή του ραχιαίου πυρήνα ραφής (*nucleus raphe dorsalis*) σε επίμυες χρησιμοποιώντας DPV (28, 39), και οι *Ozel et al.* (2011) μέτρησαν σεροτονίνη *in vivo* με DPV σε έμβρυα του είδους *Danio rerio* (γνωστό ως *zebrafish*, ή σε ελεύθερη απόδοση στα ελληνικά *Ζεβρόψαρο*) (18). Τέλος, υπάρχει μια πληθώρα άλλων παρόμοιων τεχνικών, όπως η *Differential Normal Pulse Voltammetry* (DNPV) (13, 20, 38), η *Differential Double Pulse Voltammetry* (DDPV), η *Steady State Voltammetry* (SSV) (13), *Fast Differential Ramp Voltammetry* (FDRV) (40), *Differential Pulse Amperometry* (DPA) (26, 41) και *Square Wave Voltammetry* (SWV) (25).



Εικόνα 23. Αλλαγή της τάσεως εισόδου στην Διαφορική Βολταμμετρία (από *Theodoridis & Lambrou* (2019)) (31).

3.2.2. Ζητήματα Ευαισθησίας και Ειδικότητας των Ηλεκτροδίων

Ένας από τους βασικότερους περιορισμούς των βολταμμετρικών τεχνικών προκύπτει από το γεγονός ότι κάποιες ουσίες έχουν παρόμοια δυναμικά οξειδωσης (13, 14, 18, 32, 38). Αρκετοί νευροδιαβιβαστές ενδέχεται να οξειδώνονται μαζί με τους μεταβολίτες τους σε ένα πολύ στενό εύρος τάσης (π.χ. ντοπαμίνη και DOPAC, σεροτονίνη και 5-HIAA) (38), το οποίο αν συνδυαστεί με το γεγονός ότι οι μεταβολίτες παρουσιάζουν μεγαλύτερες εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις από τους γονείς νευροδιαβιβαστές (14, 38) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η εκτίμηση μιας χημικής ουσίας δεν μπορεί να είναι επαρκής χωρίς επικουρικές μεθόδους (μικροδιάλυση, φαρμακολογική ταυτοποίηση) (14, 38, 42). Οι *Ozel et al.* (2011), αναφέρουν ότι το ασκορβικό οξύ είναι το κυρίαρχο παρεμβαλλόμενο μόριο που παράγει υψηλές συγκεντρώσεις σε περιοχές χαμηλής τάσης και είναι δύσκολο να διακριθεί από τη σεροτονίνη (18), ενώ οι *Kawagoe et al.* (1993), υποδεικνύουν τα AA και DOPAC ως τις επικρατούσες παρεμβαλλόμενες ουσίες στην ανίχνευση ντοπαμίνης (15), καθώς επίσης το ουρικό οξύ και το 5-HIAA ως τις ουσίες που παρουσιάζουν μέγιστη επέμβαση στον εντοπισμό της σεροτονίνης (15). Σε αυτές τις αναφορές υποστηρίζεται επίσης ότι η νορεπινεφρίνη και η ντοπαμίνη εκδηλώνουν παρόμοια βολταμμογράμματα (15, 20).

Στο πολυσύνθετο εξωκυττάριο περιβάλλον, όπως στην περίπτωση των *in vivo* πειραμάτων, η ικανοποιητική εκλεκτικότητα είναι παράγοντας πρωταρχικής σημασίας για τη μελέτη της φυσιολογίας των νευροδιαβιβαστών (18). Για επιτευχθεί αυτός ο στόχος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές προσεγγίσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν i) μετατροπές της επιφάνειας του ηλεκτροδίου (13-15, 20, 43), ii) επιλογή μιας περιοχής του εξωκυτταρικού υγρού όπου η ουσία που μας ενδιαφέρει διατηρεί μια υψηλή συγκέντρωση ενώ άλλες παρεμβαλλόμενες ουσίες παραμένουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις (14, 15, 20), iii) αλλαγές στο ρυθμό σάρωσης (20), iv) αλλαγές στο pH (16), v) φαρμακολογικές προεπεξεργασίες (14, 15), v) χρήση κατάλληλων μαθηματικών μοντέλων (38) και vi) συνδυασμός με άλλες μεθόδους, όπως η μικροδιάλυση (15), και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (high pressure liquid chromatography/HPLC) (14).

3.2.2.1. Τροποποιήσεις στην Επιφάνεια του Ηλεκτροδίου

Στη βολταμμετρία απαιτείται ένα σύστημα τριών ηλεκτροδίων (21). Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει α) το ηλεκτρόδιο εργασίας, όπου εφαρμόζεται η τάση εισόδου, β) το ηλεκτρόδιο αναφοράς, συνήθως χλωριούχου αργύρου (Ag/AgCl) (17-22) (παρά το γεγονός ότι σε πρώιμα πειράματα τα ηλεκτρόδια υδρογόνου θεωρούντο ως ηλεκτρόδια αναφοράς, αλλά αντικαταστάθηκαν λόγω της δυσκολίας στη χρήση τους (17). Επίσης, άλλα ηλεκτρόδια

που έχουν αναφερθεί ήταν τα ηλεκτρόδια υδραργύρου (44)), και γ) το βοηθητικό ηλεκτρόδιο (συνήθως ένα σύρμα λευκόχρυσου (16, 18, 19, 21)). Η διάμετρος του ηλεκτροδίου εργασίας εκτείνεται σε αρκετά μικρόμετρα (μm), όπως περιγράφεται σε μια πληθώρα αναφορών. Έτσι, αναφέρονται χρησιμοποιούμενα ηλεκτρόδια με διαμέτρους των 30 μm (21), 12 μm (38), 8 μm (19), 5-10 μm (33), 7 μm (22, 32), 10 μm (17), 10-20 μm (15) κτλ. Οι *Bath et al.*(2000) περιγράφουν δύο είδη ηλεκτροδίων με ίνες άνθρακα: το ThorneI P55 (10 μm διάμετρος) και το ThorneI T650 (7 μm διάμετρος) (35). Συμπερασματικά, τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ηλεκτρόδια εργασίας έχουν διάμετρο μέσα στο εύρος των 1-35 μm (14, 15), ενώ οι *Hochstetler & Wightman* (1998) ισχυρίζονται ότι είναι δυνατό να κατασκευαστούν ηλεκτρόδια με διάμετρο από 500nm έως 2 μm (17). Επιπλέον, οι *Chen et al.*(2003) κατασκεύασαν ηλεκτρόδια ινών άνθρακα με διάμετρο από 100 έως 300nm (45). Τέλος, το μήκος του ηλεκτροδίου εργασίας κυμαίνεται στο εύρος των 50-500 μm (17, 19, 38, 39).

Τα ηλεκτρόδια εργασίας κατασκευάζονται κυρίως από ίνες άνθρακα ή ίνες βασισμένες στον άνθρακα (13, 18, 19, 21, 22), επειδή ο άνθρακας είναι ένα ηλεκτροχημικά ευσταθές στοιχείο, ειδικά στις περιπτώσεις των βιοχημικών αντιδράσεων (15, 17, 33), προκαλώντας την ελάχιστη δυνατή ζημιά στους ιστούς (33). Έχουν εφαρμοστεί μεταλλικά ηλεκτρόδια, αλλά αναφέρθηκαν ως ασταθή για *in vivo* εφαρμογές (15). Οι *Park et al.* (2005) όμως ανέφεραν την χρήση ηλεκτροδίων από διαμάντι στην ηλεκτροχημεία (46), τα οποία παρέχουν αυξημένη ευστάθεια, ευαισθησία και δυνατότητα επαναχρησιμότητας, υπερβαίνοντας τις επιδόσεις των ηλεκτροδίων με ίνες άνθρακα (33). *Ozel et al.* (2011) ανέφεραν ότι ηλεκτρόδια ανθρακικών ινών επικαλυπτόμενα με χιτοζάνη (ένα πολυμερές) παράγουν μία απωθητική δράση κατά του ασκορβικού οξέος, του ουρικού οξέος και των ανιόντων (5-HIAA, DOPAC), ενώ την ίδια στιγμή η σεροτονίνη προσελκύεται και φορτίζεται θετικά (18). Η χιτοζάνη είναι ένα βιοσυμβατό υλικό και εκφράζει μεγάλη μηχανική ισχύ και αυξημένη ευστάθεια (18). Οι *Falat & Cheng* (1982) επινόησαν έναν επαρκή διαχωρισμό του ασκορβικού οξέος και των κατεχολαμινών με κατάλληλες τροποποιήσεις ενός ηλεκτροδίου άνθρακα (47). Επιπροσθέτως, οι *Nagy et al.* (1982) ανέφεραν έναν ελαφρώς διαφορετικό τρόπο, εγχέοντας ασκορβική οξειδάση (AAOX) μεταξύ της επιφάνειας του ηλεκτροδίου και μιας περιβάλλουσας μεμβράνης, το οποίο προκάλεσε την οξειδωση του ασκορβικού οξέος πριν αυτό έρθει σε επαφή με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου (48). Μια ποικιλία εργασιών περιγράφουν την χρήση ηλεκτροδίων με επίστρωση *Nafion*, τα οποία ενισχύουν την εκλεκτικότητα στα κατιόντα (DA) ενάντια στα ανιόντα (AA, DOPAC) (13-15, 33, 49). Σε μια ενδιαφέρουσα εργασία του, ο *Broderick PA* (1990) αποδεικνύει ότι τα ηλεκτρόδια από στεφανικό γραφίτη μετρούν τις ουσίες AA, DA and 5-HT στα δυναμικά των 55mV, 140mV

και 290mV, αντίστοιχα, χωρίς να εντοπίζει τις παρεμβαλλόμενες ουσίες DOPAC και 5-HIAA (36). Σημαντική εφαρμογή αυτού του ηλεκτροδίου είναι η ανίχνευση και ο διαχωρισμός της νορεπινεφρίνης από την ντοπαμίνη (36).

Παρόλα αυτά, είναι γενικώς αποδεκτό ότι οι παραπάνω τροποποιήσεις ελαττώνουν το χρόνο απόκρισης, παρέχοντας ηλεκτρόδια ανίκανα να μετρήσουν ταχείες αλλαγές στις φυσιολογικές, ή *in vivo* συγκεντρώσεις των νευροδιαβιβαστών (13, 15, 20, 33, 49). Αυτά τα ηλεκτρόδια διαθέτουν χρόνο απόκρισης που πλησιάζει τα δευτερόλεπτα, ή ακόμα και τα λεπτά (15). Οι *Hermans et al.* (2006) προεπεξεργάστηκαν ηλεκτρόδια άνθρακα και πέτυχαν αυξημένη ευαισθησία στα κατιόντα (ειδικά στην ντοπαμίνη) χωρίς υπολογίσιμη απώλεια στην χρονική ανάλυση (50).

Ένα διαφορετικό ζήτημα που οφείλουμε να αποτυπώσουμε στην παρούσα εργασία, είναι η συσχέτιση μεταξύ της εκτεθειμένης επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας και του θορύβου που παράγεται ή της ανάλυσης της μέτρησης. Συνοπτικά, εάν η επιφάνεια του ηλεκτροδίου εκτείνεται εκτός της περιοχής που μας ενδιαφέρει, πολλές ουσίες μπορεί να έρθουν σε επαφή με το ηλεκτρόδιο, και άρα ερχόμαστε αντιμέτωποι με ενισχυμένο θόρυβο (λόγω της αυξημένης χωρητικότητας) και μειωμένη χωρική ανάλυση, εξαιτίας της ανίχνευσης αυτών των υπολειπόμενων ουσιών (17, 33). Από την άλλη μεριά, οι *Budai et al.* (2010) ισχυρίζονται ότι μια εξαιρετικά μικρή επιφάνεια ηλεκτροδίου παράγει περιορισμένη επίδοση και χαμηλό σηματοθορυβικό λόγο (32).

3.2.2.2. Επιδράσεις του Ρυθμού Σάρωσης

Σε γενικό επίπεδο, στη βολταμετρία έχουν εφαρμοστεί ρυθμοί σάρωσης από την τάξη των $\mu\text{V}/\text{sec}$ μέχρι τα mV/sec (17). Παρόλα αυτά, το αχανές διαθέσιμο εύρος της τάσης εισόδου, ασκεί επιρροή στον θόρυβο χωρητικότητας και στο πλάτος του ρεύματος φόρτωσης, όπως επίσης στην εκλεκτικότητα και την ευαισθησία (20). Στους αργούς ρυθμούς σάρωσης, η χωρητικότητα στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου-διαλύματος είναι μεγαλύτερη, αν συγκριθεί με την αντίστοιχη σε γρήγορους ρυθμούς σάρωσης. Συνεπώς, για χαμηλό χωρητικό θόρυβο απαιτούνται υψηλοί ρυθμοί σάρωσης (17, 44).

Σε υψηλούς ρυθμούς σάρωσης (άνωθεν της τάξης των V/sec) το ρεύμα φόρτωσης μεγενθύνεται (13, 15, 17, 36, 44) λόγω της αναλογικής του σχέσης με το ρυθμό αυτό (13, 15, 20). Το ρεύμα Faraday είναι ανάλογο με την τετραγωνική ρίζα του ρυθμού σάρωσης (13, 15), συνεπώς βραδύτεροι ρυθμοί (της τάξης των mV/sec (13) ή γενικά κοντά στα V/sec (17)) δρουν

κατασταλτικά στο ρεύμα φόρτωσης, με κόστος βέβαια στην χρονική ανάλυση (15, 17). Ο *Stamford JA* (1985) αναφέρει ότι ο ρυθμός σάρωσης επηρεάζει τον αριθμό των κορυφών που μετρώνται από τη βολταμετρική τεχνική (σε χαμηλότερους ρυθμούς περισσότερες κορυφές είναι πιθανό να εντοπιστούν (13)), όπως επίσης και την ένταση του φαινομένου της ηλεκτροκατάλυσης (13).

3.2.2.3. *Επιδράσεις του pH*

Πολλές χημικές ουσίες (θιόλες, φαινόλες, κλπ.) παρουσιάζουν δυναμικά οξειδωσης που μεταβάλλονται ανάλογα με το pH (16). Αυτή η ιδιότητα μπορεί να φανεί χρήσιμη εάν θέλουμε να ενισχύσουμε την επιλεκτικότητα (16). Οι *Nussbaum et al.* (1992) ισχυρίζονται ότι υπό την επίδραση of *1-cyanobenz[f] isoindole* (CBI), οι αμίνες μπορούν να διαχωριστούν από άλλες παρεμβαλλόμενες ουσίες (16). Πιο συγκεκριμένα, στην ίδια αναφορά συμπεραίνεται ότι τα παραγωγά του CBI (CBI-γλουταμικό οξύ, CBI γλυσίνη, κλπ.) κατέχουν τιμές οξειδωσης ανεξάρτητες των μεταβολών στο pH, την ίδια στιγμή που οι φαινόλες μπορούν να μεταφερθούν σε υψηλότερα δυναμικά οξειδωσης, υπό τη λειτουργία σε χαμηλότερο pH (16). Οι *Serifi et al.* (2015), παρατήρησαν μια ελάττωση των τιμών οξειδωσης διαφόρων ουσιών, μετά από μια αύξηση στο pH (51). Για παράδειγμα, η νορεπινεφρίνη εκδήλωσε μια ανοδική κορυφή στα 750mV (pH=4), στα 320mV (pH=7,4), στα 150mV (pH=9) και στα -10mV (pH=11) (51). Η L-DOPA παρουσίασε κορυφές στα 470mV, 250mV, 150mV and 70mV, αντίστοιχα (51).

3.3. Άλλες Αναλυτικές Τεχνικές

Πέρα από τις βολταμετρικές τεχνικές που περιγράφηκαν παραπάνω, διαμορφώθηκε μια αξιολογή συζήτηση γύρω από τη σύγκριση αυτών των βολταμετρικών μεθόδων με τεχνικές διάχυσης. Οι τεχνικές αυτές εφαρμόστηκαν πρώτη φορά στη διάρκεια του δεύτερου μισού του 20^{ου} αιώνα, και αποτελούνταν κυρίως από τις εξής μεθόδους: *cortical cup*, *push pull cannula* και *μικροδιάλυση* (13, 14). Από τις παραπάνω μεθοδολογίες, η πιο προηγμένη είναι η μικροδιάλυση, κυρίως λόγω της μεμβράνης διάλυσης που εφαρμόζεται στην άκρη του ηλεκτροδίου, αποτρέποντας την εξωτερική διάχυση και τη διαταραχή των ιστών (13, 14). Τα ηλεκτρόδια που χρησιμοποιούνται στη μικροδιάλυση έχουν διάμετρο στο εύρος των 200-300μm, ενώ, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα ηλεκτρόδια της βολταμετρίας πρόσκεινται στο εύρος των 10-35μm (13-15, 20). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το ηλεκτρόδιο που χρησιμοποιείται στη μικροδιάλυση να προκαλεί υπερβολική και ανεπιθύμητη διαταραχή ή τραυματισμό της περιοχής του εγκεφάλου στην οποία εισχωρεί (13-15, 20). Αντιθέτως, τα βολταμετρικά ηλεκτρόδια προκαλούν την ελάχιστη δυνατή ζημιά, και έτσι μπορούν να

μετρήσουν ηλεκτροχημικές ουσίες σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου (χωρική ανάλυση της τάξης των μm) (13, 19, 20, 52).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των ηλεκτροχημικών τεχνικών είναι και η χρονική ανάλυση. Οι βολταμμετρικές τεχνικές είναι κατάλληλες για μετρήσεις σε διαστήματα των 100ms (14), ή των 250ms, όπως ανέφερε ο *Stamford JA* (1985) (13), και γενικά αποτυπώνουν παροδικά συμβάντα εύρους 10-500ms (35). Αυτή η δυνατότητα είναι κρίσιμη, από την στιγμή που η ανίχνευση της απελευθέρωσης ή πρόσληψης νευροδιαβιβαστών συμβαίνει σε διαστήματα μικρότερα του ενός δευτερολέπτου (20, 35). Παρόλα αυτά, οι βολταμμετρικές τεχνικές εκδηλώνουν περιορισμένες δυνατότητες στη μέτρηση μη παροδικών, μεγάλης χρονικής κλίμακας μεταβολών (19, 20), ενώ οι μετρήσεις με μικροδιάλυση περιορίζονται σε διαστήματα 5-20 λεπτών (14, 15) (χρονική κλίμακα της τάξης των λεπτών ή ωρών (20)).

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η μικροδιάλυση εκδηλώνει υψηλή ευαισθησία και επιλεξιμότητα, όντας ικανή να ανιχνεύσει οποιαδήποτε χημική ουσία, ανεξαρτήτως της δυνατότητας αυτής να οξειδώνεται (14, 15, 20).

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία, έχει ως στόχο την ανάλυση του βολταμμετρικού σήματος, το οποίο προέκυψε από πειραματισμό σε *in vitro* και *in vivo* πειραματικές διατάξεις. Ειδικότερα, οι αρχικές πειραματικές διατάξεις αφορούσαν στην ταυτοποίηση μονοαμινών, εντός διαλύματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη, σε βιολογικά υγρά σε ηλεκτροχημική κυψέλη και τέλος στον εγκέφαλο επίμυων. Το υλικό, οι πειραματικές διατάξεις και τα δεδομένα της παρούσης εργασίας προέκυψαν από πειράματα, που έγιναν στο Πανεπιστήμιο του Μαρβούργου (Philipps-Universitaet, Marburg, Germany), στο ινστιτούτο Νευροχημείας του ανωτέρω πανεπιστημίου. Οι πειραματικές διατάξεις πραγματοποιήθηκαν κατά την περίοδο 1993-95 από τον Γεώργιο Λάμπρου, μέλος ΕΔΙΠ της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η μελέτη χωρίστηκε σε διαφορετικά μέρη. Το πρώτο μέρος της μελέτης αφορούσε στην ανάλυση και ψηφιοποίηση του σήματος, μιας και λόγω της παλαιότητας των μετρήσεων, αυτές ήταν καταγεγραμμένες μόνο σε αναλογική μορφή, ήτοι σε εκτύπωση πολυρογράφου. Το δεύτερο στάδιο αφορούσε στην ταξινόμηση και προ-επεξεργασία των συλλεχθέντων σημάτων. Το τρίτο στάδιο αφορούσε στο μετασχηματισμό του σήματος με τη μέθοδο Fourier και τέλος στην ταξινόμηση των σημάτων με σκοπό την ανίχνευση κοινών μοτίβων σήματος ανάλογα με την υπό ταυτοποίηση ένωση.

ΜΕΡΟΣ ΙΙ
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4-ΥΛΙΚΟ

4.1. Χημικά και Διαλύματα

Για τις *in vitro* μετρήσεις, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα διαλύματα με σκοπό τον έλεγχο των ηλεκτροδίων. 5-υδροξυ-τροπταμίνη (Σεροτονίνη, 5-HT), 5-υδροξυ-ινδολο-3-ακετονικό οξύ (5-HIAA), 5-υδροξυ-τροπτοφάνη (5-HTP), Αδρεναλίνη (A), νοραδρεναλίνη (NA), ντοπαμίνη (DA), 3,4-δihυδροξυφαινόλο ακετονικό οξύ (DOPAC), μονοαμινο-οξειδάση (MAO), αναστολέας μονοαμινο-οξειδάσης, ασκορβικό οξύ (AA), ουρικάση, ουρικό οξύ (UA), σαλικυλικό οξύ (SA), 2,5-δihυδροξυ-βενζοϊκό οξύ (2,5-DHB), 2,3-δihυδροξυ-βενζοϊκό οξύ (2,3-DHB), Chloral Hydrate (CH), ηπαρίνη. Τα διαλύματα *Ringer* αποκτήθηκαν, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά, από την Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich GmbH). 1×PBS κατασκευάστηκε στο εργαστήριο όπως περιγράφηκε προηγουμένως (4, 10).

4.2. Ηλεκτρόδια

Διάφορα ηλεκτρόδια εφαρμόστηκαν για την διεξαγωγή των μετρήσεων, *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo*. Κατασκευάστηκαν μικροηλεκτρόδια ανθρακικών ινών εγκιβωτισμένων σε γυαλί (Carbone Lorraine, France) όπως περιγράφηκε παραπάνω (15, 53, 54). Όλα τα ηλεκτρόδια αποτελούνται από ίνες άνθρακα ή παράγωγα άνθρακα (γραφίτης). Χρησιμοποιήθηκαν τρία είδη ηλεκτροδίων: ηλεκτρόδια πολλαπλών ινών (διάμετρος: 50μm και μήκος: 500μm), ηλεκτρόδια μίας ίνας (διάμετρος: 10μm και μήκος: 500μm) (53) και ηλεκτρόδια γραφίτη (διαμέτρου ~150μm και μήκους ενός χιλιοστού) τα οποία τοποθετήθηκαν μέσα σε σωληνάκια γυαλιού και σφραγίστηκαν με epoxy κόλα (Epon 828 with 14% m-phenylenediamine/w). Τα ηλεκτρόδια γραφίτη κατασκευάστηκαν στα εργαστήρια Fine Mechanics (Feinmechanik Labor) του πανεπιστημίου Philipps-Universitaet, Marburg, Germany. Τα μικροηλεκτρόδια ελέγχθηκαν στη συνέχεια με ένα οπτικό μικροσκόπιο. Όσα παρουσίασαν ένα ικανοποιητικό σφράγισμα μεταξύ του γυαλιού και της ανθρακικής ίνας κόπηκαν με νυστέρι σε μήκος περίπου 500μm, ενώ όλα τα υπόλοιπα πετάχτηκαν. Τα ηλεκτρόδια αναφοράς είναι χλωριωμένα ασημένια σύρματα (διαμέτρου 0.5 mm, Sigma-Aldrich) σε 0.1M HCl. Όλα τα μετρούμενα δυναμικά έγιναν με αναφορά στο ηλεκτρόδιο Ag⁺/AgCl. Πριν την χρήση, τα ηλεκτρόδια εμβαπτίστηκαν σε 2-προπανάλη, η οποία είχε διηθηθεί πρώτα με Norit A-activated carbon (ICN, Costa Mesa, CA) για τουλάχιστον 10 λεπτά (35) και προεπεξεργαστεί σε 1×PBS ως εξής: 2.8V για 20sec, 0.8V για 5sec και 1.5V για 5sec.

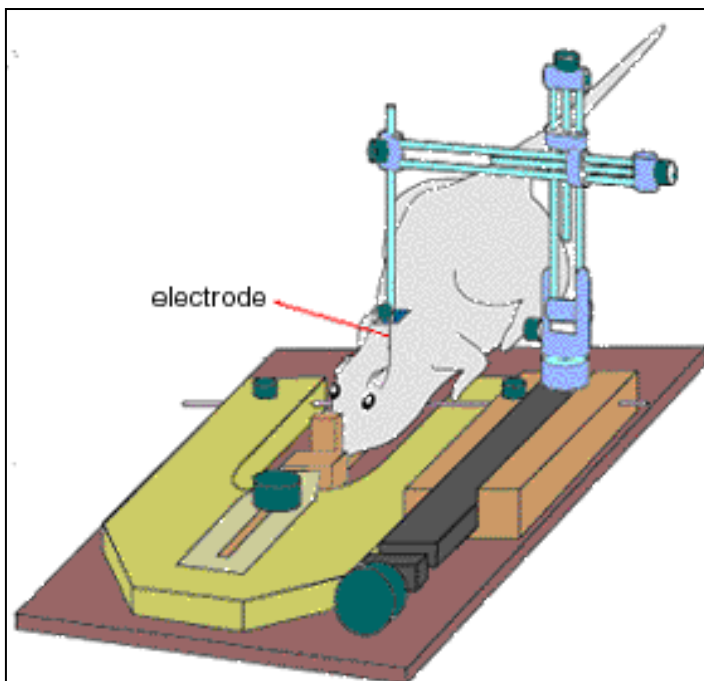
4.3. Επίμυες και Νευροχειρουργική Επέμβαση

Ενήλικα αρσενικά ποντίκια *Lewis-Wistar* (βάρους 280-320gr) χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικά μοντέλα για τις *in vivo* μετρήσεις. Τα ποντίκια στεγάστηκαν με ελεύθερη πρόσβαση σε φαγητό και νερό (*ad libitum*) σε έναν κύκλο 12 ωρών φωτός και 12 ωρών σκοταδιού (θερμοκρασία δωματίου: 23°C, υγρασία: 60%). Τα ενήλικα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν υπό μία δόση 400 mg/kg Chloral Hydrate (CH) (ή ενός ml για κάθε 200gr σωματικού βάρους) και τοποθετήθηκαν σε μια στερεοτακτική συσκευή *David Kopf* για περαιτέρω χειρουργικές διαδικασίες (**Εικόνα 24**, **Εικόνα 25**). Οι μετρήσεις ελήφθησαν κυρίως στο ραβδωτό σώμα και στη μέλαινα ουσία του εγκεφάλου του ποντικιού (πρόσθια (*Anterior*), πλευρικός (*vertical*) και οπισθίως (*lateral*)) συντεταγμένες υπολογίστηκαν με βάση το εγχειρίδιο *Mouse and Rat Brain Atlas* των *Paxinos & Watson* (1982) (55).

Τα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν με CH 400mg/kg, και τοποθετήθηκαν σε ένα στερεοτακτικό πλαίσιο *David Kopf* (Bilany, FRG) για την εμφύτευση των ηλεκτροδίων. Τα ηλεκτρόδια εμφυτεύτηκαν στον επικλινή πυρήνα (*nucleus accumbens*) και συντεταγμένες: interaural zero: anterior=1.7 mm, lateral=0.8mm, ventral=2.5mm. Επίσης, ηλεκτρόδια εμφυτεύτηκαν στη μέλαινα ουσία με συντεταγμένες interaural zero: anterior=4.0mm, lateral=1.9mm, vertical=2mm. Το ηλεκτρόδιο αναφοράς, Ag⁺/AgCl, τοποθετήθηκε ραχιαίως κάτω από τη μήνιγκα και στερεώθηκε με μικρές βίδες επί του κρανιακού οστού. Το ηλεκτρόδιο μέτρησης, τοποθετήθηκε κατόπιν στην ανατομική περιοχή της επιλογής, ανάλογα με την πειραματική διάταξη. Στη συνέχεια, ένα διπολικό διεγερτικό ηλεκτρόδιο (Plastics One, Roanoke, VA) εμβυθίστηκε μέσα στη μέλαινα ουσία (ventral tegmental area) με συντεταγμένες 5.2 mm posterior, 1.0mm lateral, 7.5 mm ventral. Το ηλεκτρόδιο διέγερσης ήταν χαμηλωμένο στη θέση του μέχρι που παρατηρήθηκε στο μικροηλεκτρόδιο άνθρακα ηλεκτρικά προκλητή απελευθέρωση. Ένας απομονωτής αναλογικής διέγερσης (A-M Systems) παρέδωσε μια διφασική (2ms κάθε φάση), 60-pulse, 60-Hz, 125-μΑ διέγερση. Το μικροηλεκτρόδιο ινών άνθρακα απομακρύνθηκε και το διεγερτικό ηλεκτρόδιο και ασφαλίστηκε κατάλληλα. Όλες οι πειραματικές διατάξεις έγιναν με βάση τον κώδικα δεοντολογίας για τη μεταχείριση των ζώων του Πανεπιστημίου Νότιας Καρολίνας Animal Care and Use Committee.



Εικόνα 24. Model 900 Small Animal Stereotaxic Instrument²².



Εικόνα 25. Σκίτσο αναπαράστασης, επίμνος σε στερεοτακτικό μηχανισμό²³.

²²<http://kopfinstruments.com/product/model-900-small-animal-stereotaxic-instrument/>

²³<http://neurowiki2013.wikidot.com/individual:optogenetics:basics>

5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5-ΜΕΘΟΔΟΣ

5.1. Ανάκτηση Δεδομένων

Το εύρος του σήματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν από -0.150V έως $+0.600\text{V}$ και η ενίσχυση εξαρτήθηκε από την ισχύ του σήματος κάθε μέτρησης. Οι λήψεις βολταμμετρικών σημάτων υλοποιήθηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω. (56-58) Οι μετρήσεις έγιναν με έναν ορθογώνιο παλμό (-0.1 έως 0.6V έναντι ηλεκτροδίου Ag^+/AgCl , $400\text{V}\cdot\text{sec}^{-1}$) επαναλαμβανόμενο κάθε 100 msec . Το ηλεκτρόδιο διατηρήθηκε στα -0.4 V μεταξύ των σαρώσεων. Η κυματομορφή παράχθηκε και το βολταμμετρικό σήμα καταγράφηκε από έναν πολαρογράφο. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το *BIOPULSE Pulse Voltammetry System* (SOLEA amplifier, TACUSSEL Electronique, Lyon-Villeurbanne, France). Χρησιμοποιήθηκε επίσης ένας τροποποιημένος πολαρογράφος E506 (Metrohm, FRG) για τη λήψη των μετρήσεων διαφορικής βολταμμετρίας (Differential Pulse Voltammetry/DPV).

5.2. Recording Sessions

Την ημέρα του πειράματος, ένα μικροηλεκτρόδιο ιών άνθρακα εμφυτεύθηκε στο ανατομικό σημείο ενδιαφέροντος με τη βοήθεια ενός μικρο-οδηγού (Microdrive) (University of North Carolina, Department of Chemistry, Instrument Shop). Η θέση του μικροηλεκτροδίου βελτιστοποιήθηκε ελέγχοντας μια ηλεκτρικώς προκλητή απελευθέρωση ντοπαμίνης (biphasic, 2 ms perphase, 24 pulses , 60 Hz , $125\mu\text{A}$). Όταν παρατηρήθηκε ένα σημαντικά ικανοποιητικό σήμα, στο ανατομικό σημείο ενδιαφέροντος, θεωρήθηκε αυτό ως η απαρχή των μετρήσεων (19). Τα καταγεγραμμένα δεδομένα, εκτυπώθηκαν σε χαρτί με τη χρήση πολαρογράφου και οι μετρήσεις κρατήθηκαν για περαιτέρω επεξεργασία.

5.3. Ψηφιοποίηση Δεδομένων

Για την επεξεργασία των δεδομένων έπρεπε να πραγματοποιηθεί πρωτίστως η ψηφιοποίηση τους. Η ψηφιοποίηση των δεδομένων, δηλαδή των βολταμμογραμμάτων, έγινε χειρονακτικά. Τα γραφήματα σχεδιάστηκαν σε μιλιμετρέ ριζόχαρτο μεγέθους A3 ($297\times 420\text{mm}$), και ελήφθησαν μετρήσεις του μήκους του βολταγράμματος ανά 1 χιλιοστό του άξονα x . Δεδομένου ότι η ταχύτητα u του χαρτιού ήταν σταθερή κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων και ίση με u , χρησιμοποιούμε τη σχέση:

$$u = \frac{x}{t} \quad (5)$$

Ειδικότερα, $u = \frac{x}{t}$ (**Εξίσωση 5**), όπου u είναι η ταχύτητα του χαρτιού, x η απόσταση που διανύεται σε χρόνο t .

Αν αντικαταστήσουμε ως, $x=1\text{mm}=0.001\text{m}$, μπορούμε να λύσουμε ως προς t και να υπολογίσουμε την περίοδο ήτοι:

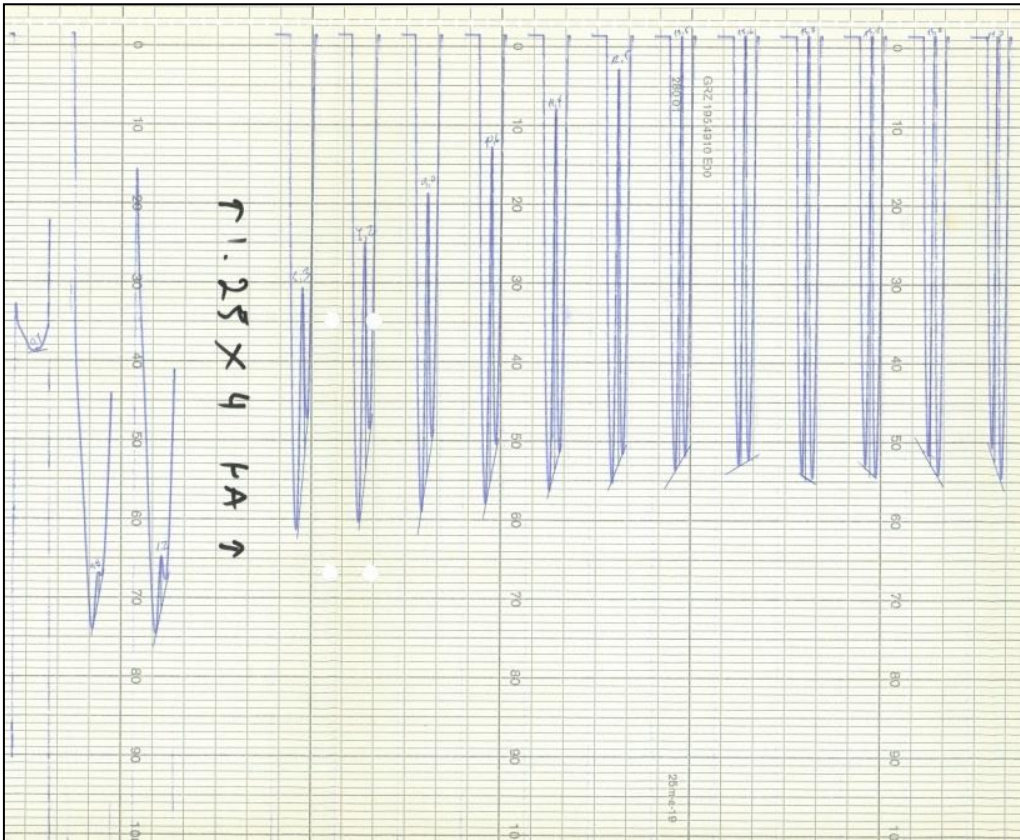
$$T = \frac{x}{u} \quad (6)$$

Ειδικότερα, $T = \frac{x}{u}$ (**Εξίσωση 6**), όπου T είναι η περίοδος της δειγματοληψίας, x η απόσταση που διανύεται και u η ταχύτητα του χαρτιού.

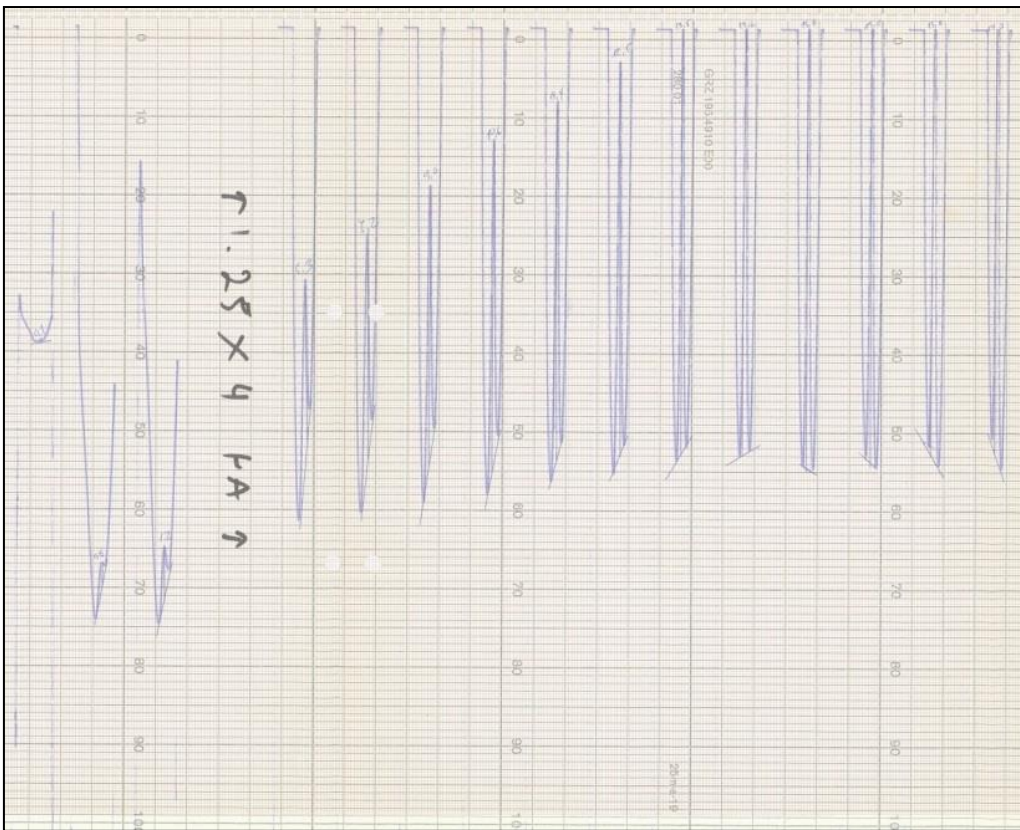
Να σημειωθεί εδώ ότι στον άξονα των y χρησιμοποιήθηκε η μικρότερη διάσταση του αντιγραφικού χαρτιού (297mm), η οποία ήταν πάντα επαρκής. Η μεγάλη πλευρά του ριζόχαρτου (420mm) χρησιμοποιήθηκε στο μήκος της μέτρησης, και όπου αυτή δεν έφτανε (όπου δηλαδή η μέτρηση υπερέβαινε τα 420mm, κάτι που ισχύει για τις περισσότερες μετρήσεις), προστέθηκαν τα αναγκαία ριζόχαρτα διαδοχικά.

Στην **Εικόνα 26** φαίνεται ένας μέρος μόνο μιας τυχαία επιλεγμένης μέτρησης, ενώ στην **Εικόνα 27** προσθέσαμε ηλεκτρονικά ένα διάφανο millimeter για να παρουσιάσουμε μια προσομοίωση της διαδικασίας. Τέλος, στην **Εικόνα 28** παρουσιάζουμε την ίδια μέτρηση μετά την ψηφιοποίηση.

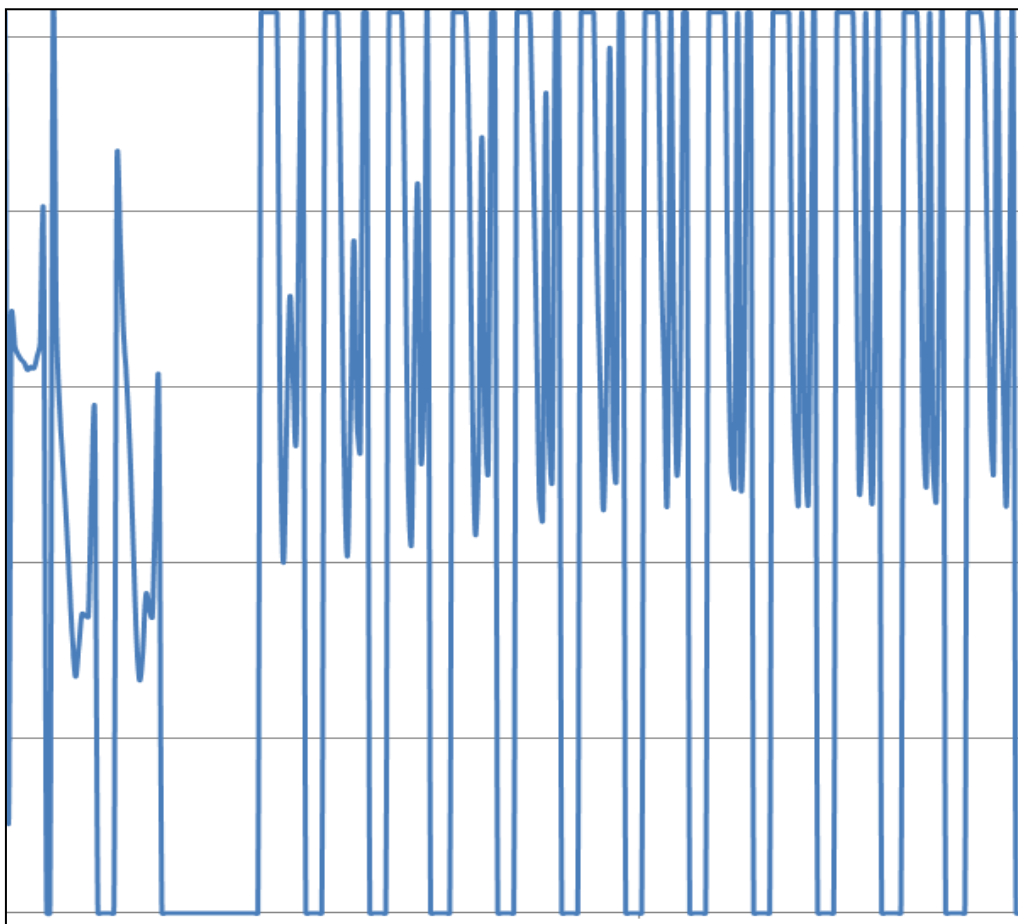
Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τη δια χειρός μέτρηση, εισήχθησαν στο πρόγραμμα Microsoft Excel®, για περαιτέρω επεξεργασία. Τα ψηφιοποιημένα σήματα, ταξινομήθηκαν με βάση το είδος της μέτρησης, τις συνθήκες της μέτρησης και τις υπό μέτρηση ενώσεις.



Εικόνα 26. Φωτογραφία μιας μέτρησης (μπλε γραφίδα).



Εικόνα 27. Η μέτρηση με την προσθήκη διάφανου millimeter.



Εικόνα 28. Αναπαράσταση με Excel της παραπάνω μέτρησης μετά την ψηφιοποίηση.

5.4. Ανάλυση Δεδομένων

Μετά τη συλλογή των δεδομένων ακολούθησε η διόρθωση θορύβου και το ψηφιακό φιλτράρισμα (4-pole Bessel filter, 2 kHz) με προγράμματα γραμμένα στο LABVIEW (National Instruments). Επειδή η κορυφή οξείδωσης της ντοπαμίνης είναι 0.65V κάτω από τις υπάρχουσες συνθήκες, εξετάστηκαν αλλαγές του ρεύματος στο συγκεκριμένο δυναμικό. Για την αξιολόγηση της παρουσίας ντοπαμίνης ατομικά, τα διορθωμένα βολταμογράμματα συγκρίθηκαν με πρότυπα βολταμογράμματα ντοπαμίνης, και υπολογίστηκε ο συντελεστής αυτοσυσχέτισης r . Εκτός από τη νορεπινεφρίνη, τα κυκλικά βολταμογράμματα όλων των ελεγχόμενων ουσιών έχουν έναν συντελεστή αυτοσυσχέτισης ίσο με 0.86 όταν συγκρίνονται με τη ντοπαμίνη. Σε αυτή την εργασία, τα κυκλικά βολταμογράμματα θεωρούντο ως ταυτοποιηθέντα με τη ντοπαμίνη μόνο εάν προέκυπτε συντελεστής αυτοσυσχέτισης $r > 0.86$.

5.4.1. Μετασχηματισμός Fourier

Τα διορθωμένα για το θόρυβο βολταμογράμματα, υπέστησαν περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυση με μετασχηματισμό Fourier. Τα σήματα ήταν διακριτού χρόνου, συνεπώς

εφαρμόσαμε Μετασχηματισμό Fourier Διακριτού Χρόνου (Discrete Time Fourier Transform (DTFT)) και Διακριτό Μετασχηματισμό Fourier (Discrete Fourier Transform (DFT)).

5.4.1.1. Μετασχηματισμός Fourier Διακριτού Χρόνου (DTFT)

Ο μετασχηματισμός Fourier διακριτού χρόνου μπορεί να ορισθεί ως ακολούθως.

Αν συμβολίσουμε το σήμα του διακριτού χρόνου ως $x[n]$, τότε ο DTFT περιγράφεται από τη σχέση:

$$X(e^{j\omega}) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} x[n]e^{-j\omega n} \quad (7)$$

Ειδικότερα, $X(e^{j\omega}) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} x[n]e^{-j\omega n}$ (Εξίσωση 7), όπου $x[n]$ είναι το σήμα

διακριτού χρόνου και ω η συχνότητα.

Η $x[n]$ γράφεται ως σύνθεση μικρών μιγαδικών ημιτονοειδών, ήτοι:

$$x[n] = \frac{1}{2\pi} \int_{-\pi}^{+\pi} X(e^{j\omega})e^{j\omega n} d\omega \quad (8)$$

Ειδικότερα, $x[n] = \frac{1}{2\pi} \int_{-\pi}^{+\pi} X(e^{j\omega})e^{j\omega n} d\omega$ (Εξίσωση 8), όπου $X(e^{j\omega})$ είναι το

Φουριεριανό μετασχημάτισμα και ω η συχνότητα.

Η σχέση αυτή αποτελεί τον αντίστροφο μετασχηματισμό Fourier (Inverse Discrete Time Fourier Transform (IDTFT)).

Ο μετασχηματισμός Fourier είναι η μιγαδική συνάρτηση της συχνότητας ω . Συνεπώς, μπορεί να εκφραστεί είτε σε καρτεσιανή μορφή:

$$X(e^{j\omega}) = X_R(e^{j\omega}) + jX_I(e^{j\omega}) \quad (9)$$

Ειδικότερα, $X(e^{j\omega}) = X_R(e^{j\omega}) + jX_I(e^{j\omega})$ (Εξίσωση 9), όπου $X_R(e^{j\omega})$ το πραγματικό μέρος της συνάρτησης και $X_I(e^{j\omega})$ το φανταστικό μέρος της συνάρτησης, είτε

σε πολική μορφή, ως $X(e^{j\omega}) = |X(e^{j\omega})|e^{j\angle X(e^{j\omega})}$, όπου $|X(e^{j\omega})|$ το μέτρο της μιγαδικής συνάρτησης και $\angle X(e^{j\omega})$ η γωνία της.

Στα πλαίσια της εργασίας αυτής, χρησιμοποιούμε την πολική αναπαράσταση του μετασχηματισμού Fourier, όπως θα φανεί και παρακάτω, στις γραφικές παραστάσεις του μέτρου και της γωνίας των μετασχηματισμών των βολταμμογραμμμάτων. Σημειώνουμε ακόμα ότι για να υπάρχει η $X(e^{j\omega})$ και να συγκλίνει ομοιόμορφα σε συνεχή συνάρτηση του ω , πρέπει η $x[n]$ να είναι απολύτως αθροίσιμη, δηλαδή να ισχύει:

$$\sum_{n=-\infty}^{+\infty} |x[n]| < \infty \quad (10)$$

Ειδικότερα, $\sum_{n=-\infty}^{+\infty} |x[n]| < \infty$ (**Εξίσωση 10**), όπου $x[n]$ το σήμα διακριτού χρόνου.

Η παραπάνω σχέση αποτελεί τη συνθήκη απόλυτης αθροισιμότητας, η οποία είναι ικανή συνθήκη ύπαρξης της $X(e^{j\omega})$. Βέβαια, δεν είναι όλες οι ακολουθίες απολύτως αθροίσιμες, αλλά υπάρχουν και τετραγωνικά αθροίσιμες ακολουθίες, για τις οποίες ισχύει:

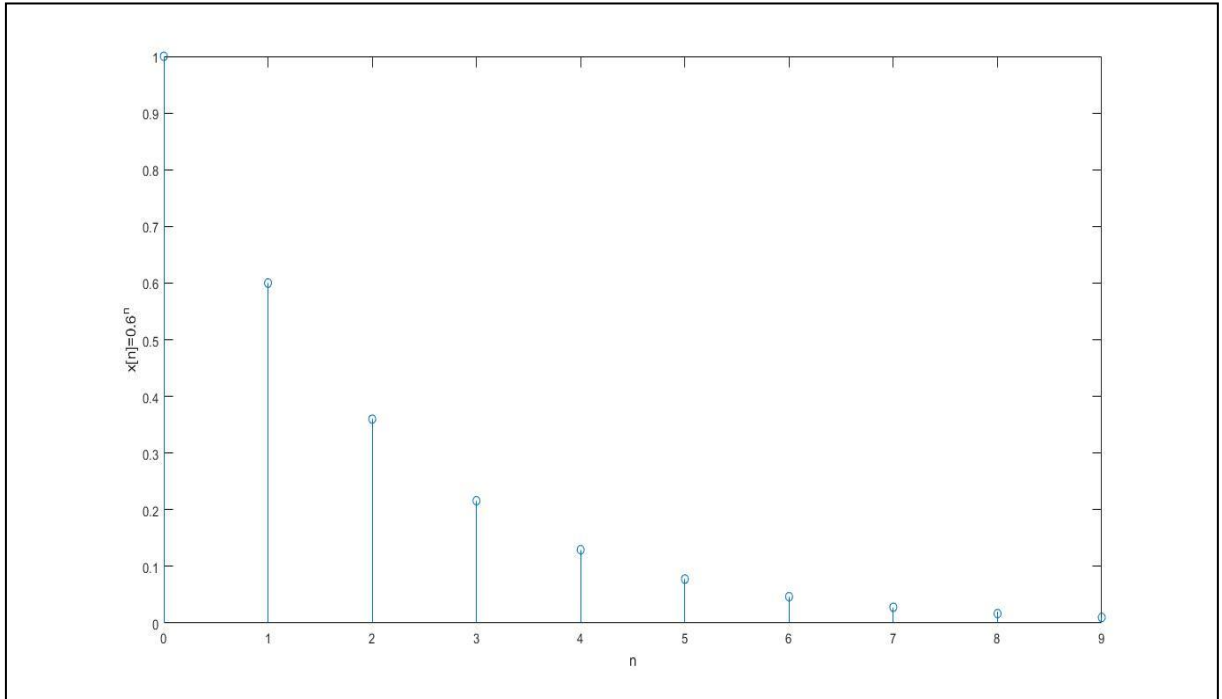
$$\sum_{n=-\infty}^{+\infty} |x[n]|^2 < \infty \quad (11)$$

Ειδικότερα, $\sum_{n=-\infty}^{+\infty} |x[n]|^2 < \infty$ (**Εξίσωση 11**), όπου $x[n]$ το σήμα διακριτού χρόνου.

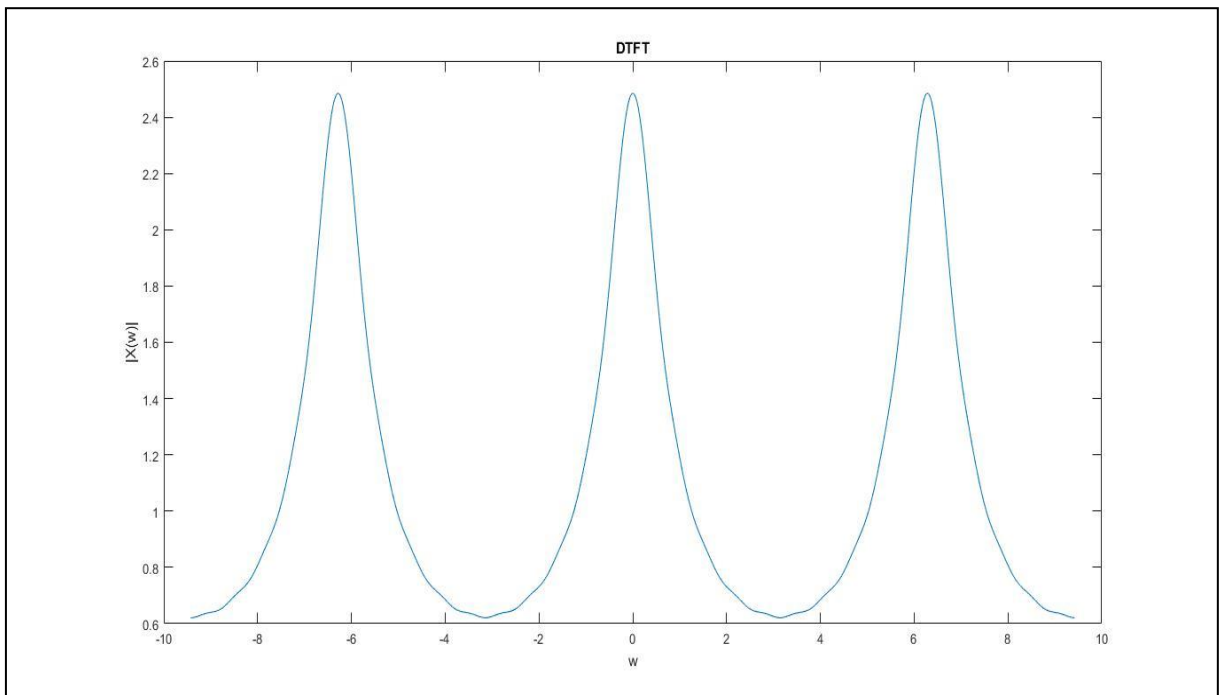
Σε αυτή την περίπτωση υπάρχει ο μετασχηματισμός Fourier και παρουσιάζει μεσο-τετραγωνική σύγκλιση. Υπάρχουν, τέλος, συναρτήσεις που δεν εκδηλώνουν ούτε απόλυτη, ούτε τετραγωνική αθροισιμότητα, αλλά που είναι χρήσιμος ο μετασχηματισμός Fourier. Τέτοιες είναι η σταθερή συνάρτηση $x[n]=1$, για κάθε n , η μοναδιαία βηματική ακολουθία $u[n]$, κλπ. Ολοκληρώνοντας αυτή τη σύνοψη, παραθέτουμε τις εξής ιδιότητες του DTFT, οι οποίες θα γίνουν διακριτές και στους μετασχηματισμούς των βολταμμογραμμμάτων των επόμενων κεφαλαίων:

α) ο DTFT είναι συνεχής και περιοδικός ως προς ω με περίοδο 2π (**Εικόνα 30**).

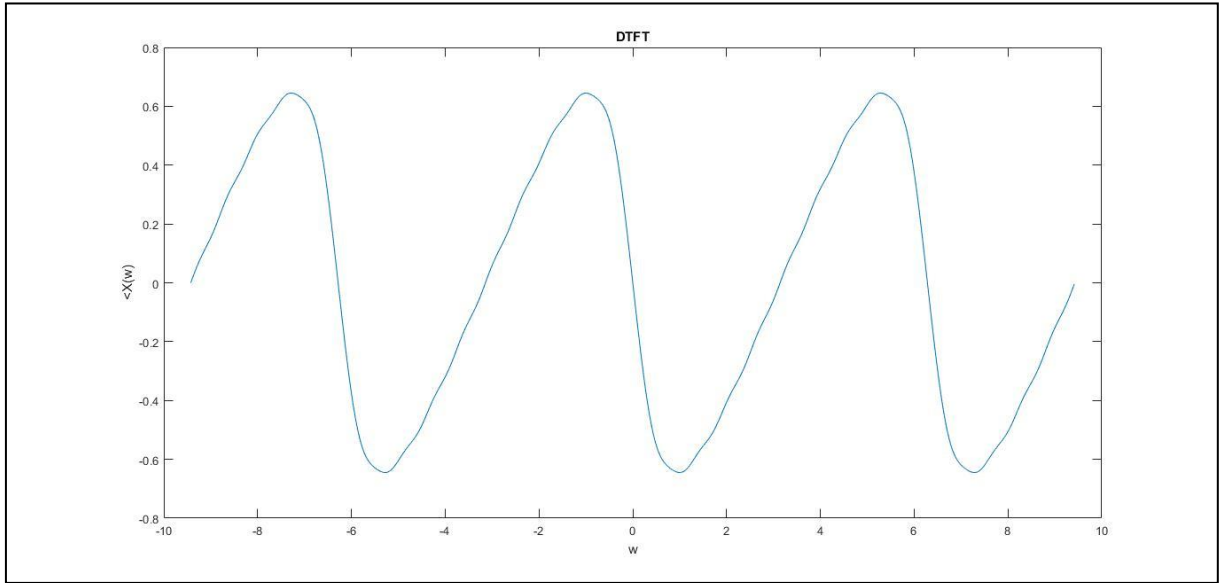
β) αν η $x[n]$ είναι πραγματική συνάρτηση, τότε το μέτρο $|X(e^{j\omega})|$ είναι άρτια συνάρτηση και η γωνία $\angle X(e^{j\omega})$ περιττή συνάρτηση ως προς ω (**Εικόνα 31**).



Εικόνα 29. Γραφική παράσταση της συνάρτησης διακριτού χρόνου $x[n]=0.6^n$, για $0 \leq n \leq 9$.



Εικόνα 30. Γραφική παράσταση του μέτρου $|X(e^{j\omega})|$ του DTFT της συνάρτησης $x[n]=0.6^n$ της προηγούμενης εικόνας. Διακρίνεται ότι το μέτρο του DTFT είναι συνεχής συνάρτηση και περιοδική ως προς ω .



Εικόνα 31. Γραφική παράσταση της γωνίας $\angle X(e^{j\omega})$ του DTFT της συνάρτησης $x[n]=0.6^n$. Φαίνεται ότι η γωνία του DTFT είναι περιττή συνάρτηση του ω .

5.4.1.2. Διακριτός Μετασχηματισμός Fourier (DFT)

Αντίστοιχα, όπως στην περίπτωση του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, ορίζεται και ο Διακριτός Μετασχηματισμός Fourier και μπορεί να ορισθεί ως ακολούθως.

Σε ένα σήμα $x[n]$ πεπερασμένου μήκους N , μπορούμε να υπολογίσουμε τον Διακριτό Μετασχηματισμό Fourier (Discrete Fourier Transform (DFT)) κατά τρόπο:

$$X[k] = \sum_{n=0}^{N-1} x[n] e^{-j \frac{2\pi nk}{N}}, 0 \leq k \leq N-1 \quad (12)$$

Ειδικότερα, $X[k] = \sum_{n=0}^{N-1} x[n] e^{-j \frac{2\pi nk}{N}}, 0 \leq k \leq N-1$ (Εξίσωση 12), όπου

όπου $x[n]$ το σήμα διακριτού χρόνου.

Ο αντίστροφος DFT (IDFT) δίνεται από την σχέση:

$$x[n] = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} X[k] e^{j \frac{2\pi nk}{N}}, 0 \leq k \leq N-1 \quad (13)$$

Ειδικότερα, $x[n] = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} x[k] e^{j \frac{2\pi nk}{N}}, 0 \leq k \leq N-1$ (Εξίσωση 13), όπου $x[n]$,

$X(k)$ ο διακριτός μετασχηματισμός Fourier του $x[n]$.

Φαίνεται λοιπόν ότι $X[k]=0$ εκτός του διαστήματος $[0, N-1]$. Οι τιμές του DFT είναι μιγαδικές, συνεπώς παρουσιάζονται οι δύο εναλλακτικοί τρόποι αναπαράστασης που εκτέθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο για τον DTFT:

α) καρτεσιανή μορφή: $X[k]=\text{Re}\{X[k]\}s+j\text{Im}\{X[k]\}$

β) πολική μορφή: $x[k] = |x[k] e^{j \angle x(k)}|$.

Ο DFT των βολταμογραμμάτων θα αποτυπωθεί γραφικά χρησιμοποιώντας την πολική μορφή.

Δύο παρατηρήσεις είναι σημαντικές:

α) ο DFT παίρνει διακριτό σήμα στον χρόνο και δίνει διακριτό σήμα στην συχνότητα, σε αντίθεση με τον DTFT που λαμβάνει σήμα διακριτού χρόνου και δίνει συνεχές σήμα στη συχνότητα (Εικόνα 32, Εικόνα 33).

β) ο DFT είναι ουσιαστικά μια δειγματοληψία στη συχνότητα του DTFT. Αυτό αποδεικνύεται ως εξής:

Έστω ένα σήμα $x[n]$, όπου $x[n]=0$ εκτός του διαστήματος $[0, N-1]$. Ο DTFT είναι δίνεται από:

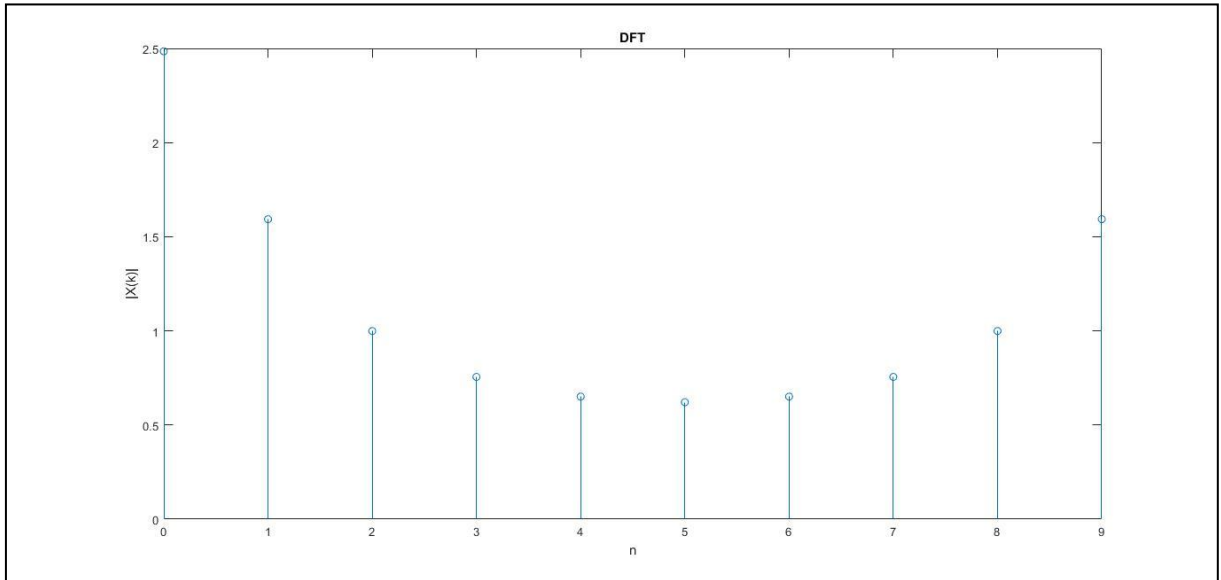
$$X(e^{j\omega}) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} x[n] e^{-j\omega n} = \sum_{n=0}^{N-1} x[n] e^{-j\omega n} \quad (14)$$

Ειδικότερα, $X(e^{j\omega}) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} x[n] e^{-j\omega n} = \sum_{n=0}^{N-1} x[n] e^{-j\omega n}$ (Εξίσωση 14),

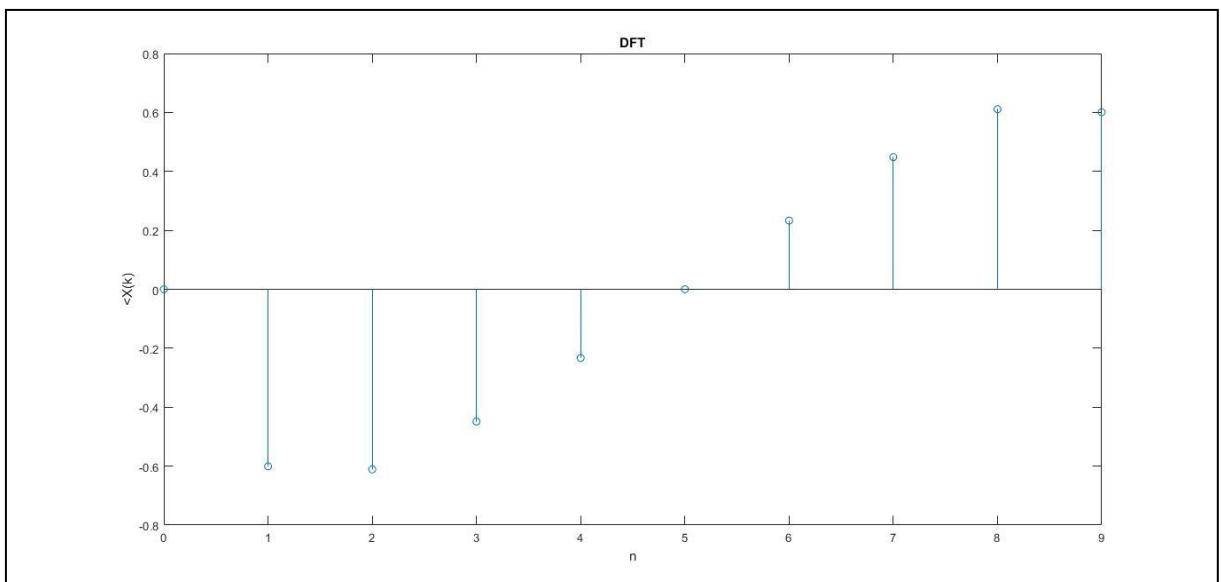
όπου $x[n]$ το σήμα διακριτού χρόνου, $X(e^{j\omega})$ ο μετασχηματισμός Fourier διακριτού χρόνου του $x[n]$, και ω η συχνότητα.

Αν αντικαταστήσουμε ως $\omega = \frac{2\pi k}{N}$, διαπιστώνουμε ότι ο DTFT γίνεται

$$X(e^{j\omega}) = \sum_{n=0}^{N-1} x[n]e^{-j\frac{2\pi nk}{N}} \quad \text{και ταυτίζεται με τον DFT.}$$



Εικόνα 32. Γραφική παράσταση του μέτρου $|X[k]|$ του DFT της συνάρτησης $x[n]=0.6^n$. Διακρίνεται ότι το μέτρο του DFT είναι διακριτή συνάρτηση, σε αντίθεση με τον DTFT.



Εικόνα 33. Γραφική παράσταση της γωνίας $\angle X[k]$ του DFT της συνάρτησης $x[n]=0.6^n$.

5.4.2. Ταξινόμηση των Δεδομένων με k-means

Τα μετασχηματισμένα σήματα, ταξινομήθηκαν περαιτέρω προς ανεύρεση κοινών προτύπων μεταξύ των διαφορετικών ενώσεων που μετρήθηκαν. Επίσης, η ταξινόμηση των σημάτων έγινε προς υπολογισμό και ταυτοποίηση άγνωστων μετρήσεων με βάση μετρήσεις γνωστών ενώσεων.

Στη συγκεκριμένη εργασία θα χρησιμοποιήσουμε αλγόριθμους συσταδοποίησης ή ομαδοποίησης (*clustering algorithms*), για την ταξινόμηση των δεδομένων, οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία της μη επιβλεπόμενης μάθησης και στοχεύουν στο διαχωρισμό των δεδομένων σε λογικές ομάδες βάσει κάποιου ορισμένου κριτηρίου. Σύμφωνα με τον ορισμό που δίνεται στο (59):

«Η συσταδοποίηση είναι μια μορφή μη επιβλεπόμενης μάθησης, δια της οποίας ένα σύνολο παρατηρήσεων (δηλ. σημείων δεδομένων) διαμερίζεται σε φυσικές ομαδοποιήσεις ή συστάδες προτύπων με τέτοιο τρόπο ώστε το μέτρο ομοιότητας μεταξύ οποιουδήποτε ζεύγους παρατηρήσεων αντιστοιχίζεται σε κάθε συστάδα να ελαχιστοποιεί μια καθορισμένη συνάρτηση κόστους».

Οι συστάδες ή ομάδες (*clusters*) μπορούν γενικά να οριστούν με δύο τρόπους. Έστω ότι το σύνολο των δεδομένων μας αποτελείται από N παρατηρήσεις: $X = \{x_1, x_2, \dots, x_N\}$.

- *Αυστηρή συσταδοποίηση (Hard ή crisp clustering)*, όπου θεωρούμε ότι κάθε διάνυσμα εισόδου x_i ανήκει αποκλειστικά σε μία ομάδα. Ορίζουμε ως m -συσταδοποίηση R τη διαμέριση του X σε m ομάδες C_1, C_2, \dots, C_m τέτοιες ώστε να πληρούν τις παρακάτω προϋποθέσεις:

i. $C_i \neq \emptyset$, για $i = 1, \dots, m$, **Εξίσωση 15**.

ii. $\bigcup_{i=1}^m C_i = X$, **Εξίσωση 16**.

iii. $C_i \cap C_j = \emptyset$, για $i \neq j$ και $i, j = 1, \dots, m$, **Εξίσωση 17**.

- *Ασαφής συσταδοποίηση (Fuzzy clustering)*, όπου κάθε διάνυσμα εισόδου x_i μπορεί να ανήκει ταυτόχρονα σε διαφορετικές ομάδες με διαφορετικό βαθμό βεβαιότητας. Σε αυτή την περίπτωση, η m -συσταδοποίηση του X χαρακτηρίζεται από m συναρτήσεις u_j που ορίζονται ως:

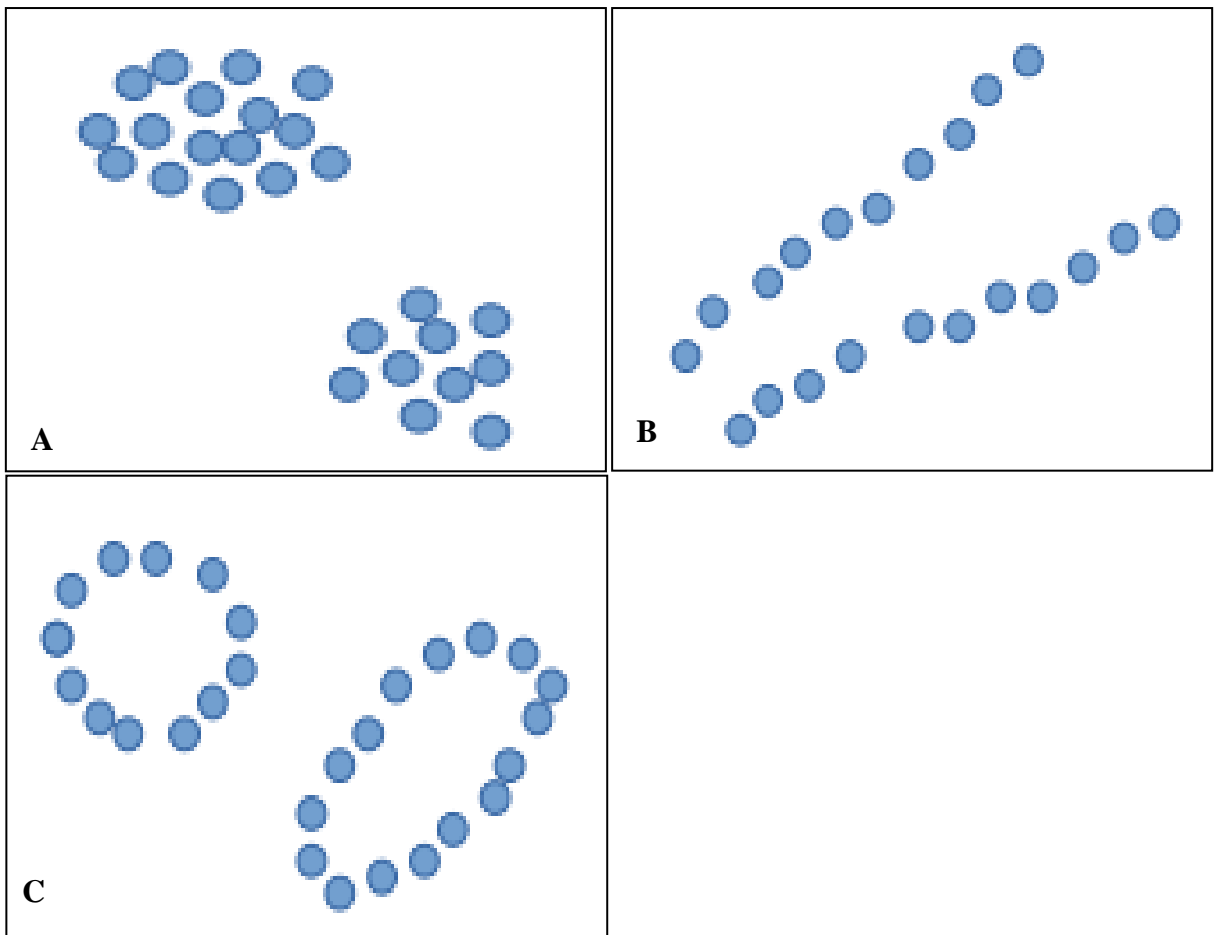
i. $u_j: X \rightarrow [0, 1]$, για $j = 1, \dots, m$, **(Εξίσωση 18)**

ii. και ισχύουν: $\sum_{j=1}^m u_j(x_i) = 1, i = 1, 2, \dots, N$, **(Εξίσωση 19)**

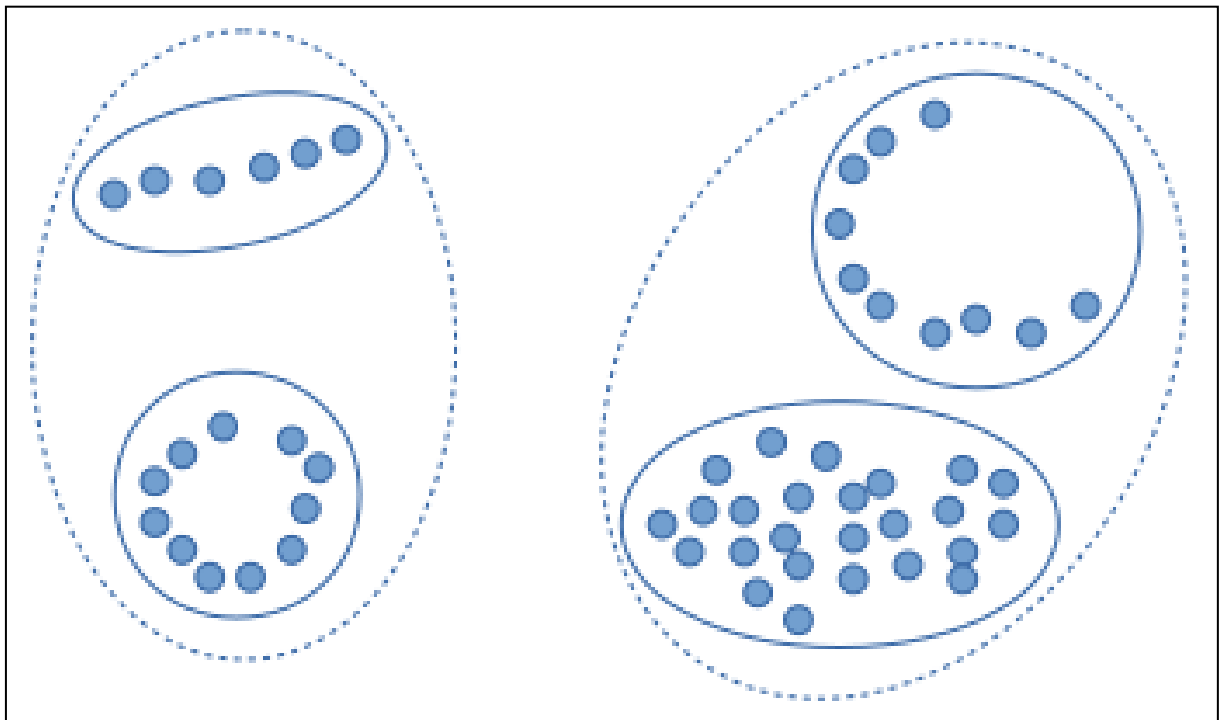
iii. καθώς $0 < \sum_{i=1}^N u_j(x_i) < N$, για $j = 1, 2, \dots, m$, **(Εξίσωση 20)**.

Οι συναρτήσεις αυτές ονομάζονται συναρτήσεις συμμετοχής και ποσοτικοποιούν τη βεβαιότητα που έχουμε για το αν κάποιο διάνυσμα εισόδου i ανήκει στην ομάδα j . Τιμές των συναρτήσεων κοντά στη μονάδα (1) υποδηλώνουν μεγάλο βαθμό συμμετοχής του διανύσματος στην αντίστοιχη ομάδα, ενώ τιμές κοντά στο μηδέν (0) υποδηλώνουν απουσία συμμετοχής (**Εικόνα 34**). Τα βασικά βήματα για τη διεξαγωγή συσταδοποίησης από ένα σύνολο δεδομένων περιγράφονται παρακάτω (**Εικόνα 35**):

- *Επιλογή χαρακτηριστικών γνωρισμάτων (features)*: Κάθε σημείο εισόδου x_i αποτελεί ένα διάνυσμα γνωρισμάτων (*feature vector*). Τα γνωρίσματα αυτά είναι μετρήσιμες εγγενείς ιδιότητες της εισόδου, βάσει των οποίων γίνεται ο διαχωρισμός σε ομάδες. Για παράδειγμα, αν θέλαμε να κατηγοριοποιήσουμε το σύνολο των ζώων, θα μπορούσαμε να επιλέξουμε ως γνώρισμα το φυσικό τους περιβάλλον κι έτσι θα προέκυπταν οι ομάδες: ζώα ξηράς, υδρόβια, κλπ. Επιθυμούμε λοιπόν να επιλέξουμε το μικρότερο δυνατό σύνολο γνωρισμάτων ώστε να κωδικοποιείται όσο το δυνατόν περισσότερη πληροφορία και να επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη δυνατή ομοιογένεια σε κάθε ομάδα.
- *Επιλογή μέτρου εγγύτητας ή γειννίας (proximity measure)*: Το μέτρο εγγύτητας εκφράζει το βαθμό “ομοιότητας” ή “εγγύτητας” μεταξύ δύο αντικειμένων. Στην περίπτωση των αλγορίθμων συσταδοποίησης επιθυμούμε να μετρήσουμε την ομοιότητα ανάμεσα σε δύο διανύσματα γνωρισμάτων ώστε να αποφασίσουμε την ένταξή τους ή μη σε κάποια ομάδα.
- *Επιλογή κριτηρίου συσταδοποίησης (clustering criterion)*: Το κριτήριο αυτό εξαρτάται από τον τύπο των συστάδων που αναμένουμε να βρει ο αλγόριθμος (συμπαγείς, επιμήκεις, ελλειψοειδείς, κλπ.) και εκφράζεται με τον ορισμό κατάλληλης συνάρτησης κόστους ή κάποιου άλλου τύπου κανόνων.



Εικόνα 34. Συμπαγείς συστάδες (A), επιμήκεις συστάδες (B), σφαιρικές και ελλειψοειδείς συστάδες (C).



Εικόνα 35. Υποκειμενικότητα συσταδοποίησης. Ένας αλγόριθμος ανακαλύπτει 2 συστάδες (διακεκομμένη γραμμή), ενώ ένας άλλος ανακαλύπτει 4 (συνεχής γραμμή).

- *Επιλογή αλγορίθμου συσταδοποίησης (clustering algorithm):* Σε αυτό το στάδιο γίνεται η επιλογή του κατάλληλου αλγορίθμου που θα οδηγήσει σε μια καλή συσταδοποίηση για ένα σύνολο δεδομένων.
- *Επικύρωση αποτελεσμάτων (validation):* Αξιολογούνται τα αποτελέσματα του αλγορίθμου συσταδοποίησης σύμφωνα με κατάλληλα κριτήρια ορθότητας.
- *Ερμηνεία αποτελεσμάτων:* Αποτελεί το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας συσταδοποίησης, όπου εμπειρογνώμονες του πεδίου εφαρμογής καλούνται να εξάγουν συμπεράσματα από τις παραχθείσες συστάδες, συνδυάζοντας κι άλλα στοιχεία και πειραματικές αναλύσεις.

Οι αλγόριθμοι συσταδοποίησης μπορούν με τη σειρά τους να διαχωριστούν σε μικρότερες κατηγορίες, ανάλογα με τον τρόπο λειτουργίας τους και τα κριτήρια που χρησιμοποιούν (60):

- *Ακολουθιακοί αλγόριθμοι (Sequential algorithms):* Εξετάζουν διαδοχικά τα δεδομένα και παράγουν μια μοναδική συσταδοποίηση. Συνήθως η σειρά με την οποία παρουσιάζονται τα δεδομένα στον αλγόριθμο επηρεάζουν την ποιότητα του τελικού αποτελέσματος.
- *Ιεραρχικοί αλγόριθμοι (Hierarchical algorithms):* Παράγουν μια ιεραρχία συστάδων, όπου οι συστάδες κάθε επιπέδου προκύπτουν από το προηγούμενο είτε με διάσπασή τους (*διαιρετικοί ιεραρχικοί αλγόριθμοι, divisive hierarchical algorithms*) είτε με συνένωσή τους (*συσσωρευτικοί ιεραρχικοί αλγόριθμοι, agglomerative hierarchical algorithms*).
- *Αλγόριθμοι βασιζόμενοι στη βελτιστοποίηση συνάρτησης κόστους (Algorithms based on cost function optimization):* Οι αλγόριθμοι αυτοί ποσοτικοποιούν την ποιότητα της συσταδοποίησης μέσω μιας συνάρτησης κόστους J , και τερματίζουν όταν επιτευχθεί κάποιο τοπικό της ακρότατο. Συνήθως ο αριθμός των συστάδων m ορίζεται στην είσοδο του αλγορίθμου και παραμένει σταθερός καθ' όλη τη διάρκεια εκτέλεσής του.

Η κατηγορία αυτή μπορεί να διαιρεθεί σε μικρότερες, ανάλογα με το αν κάθε στοιχείο εισόδου x_i ανήκει αποκλειστικά σε μια συστάδα ή σε περισσότερες ταυτόχρονα.

- *Αλγόριθμοι επέκτασης και οριοθέτησης (Branch and bound algorithms):* Έχουν τη δυνατότητα να ανακαλύπτουν την ολική βέλτιστη συσταδοποίηση με τη βοήθεια κατάλληλων παραμέτρων, χωρίς να εξετάζουν όλες τις πιθανές συσταδοποιήσεις. Το μειονέκτημά τους είναι η τεράστια υπολογιστική πολυπλοκότητα.
- *Γενετικοί αλγόριθμοι (Genetic algorithms):* Ξεκινούν από έναν αρχικό πληθυσμό συστάδων και σε κάθε βήμα παράγουν νέες, καλύτερες συστάδες από τις προηγούμενες

προσομοιώνοντας φυσικές γενετικές διαδικασίες.

- **Αλγόριθμοι αναζήτησης κοιλάδας (Valley-seeking algorithms):** Αυτοί οι αλγόριθμοι μεταχειρίζονται τα διανύσματα γνωρισμάτων ως στιγμιότυπα μιας (πολυδιάστατης) τυχαίας μεταβλητής X . Υποθέτουν ότι οι περιοχές του X όπου συσσωρεύεται μεγάλος αριθμός διανυσμάτων αντιπροσωπεύουν περιοχές υψηλών τιμών στην κατανομή πυκνότητας πιθανότητας του X , κι επομένως αποτελούν υποψήφιες συστάδες.
- **Αλγόριθμοι ανταγωνιστικής μάθησης (Competitive learning algorithms):** Οι αλγόριθμοι που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία δεν κάνουν χρήση συναρτήσεων κόστους, αλλά παράγουν πολλές διαφορετικές συσταδοποιήσεις και εν τέλει συγκλίνουν στη βέλτιστη βάση μιας μετρικής αποστάσεων.
- **Αλγόριθμοι βασιζόμενοι σε τεχνικές μορφολογικού μετασχηματισμού (Algorithms based on morphological transformation techniques):** Κάνουν χρήση μορφολογικών μετασχηματισμών ώστε να επιτύχουν καλύτερο διαχωρισμό των συστάδων.
- **Αλγόριθμοι βασιζόμενοι στην πυκνότητα (Density-based algorithms):** Θεωρούν τις συστάδες ως περιοχές του χώρου δεδομένων με ιδιαίτερα μεγάλη πυκνότητα. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ορισμού της πυκνότητας κι έτσι προκύπτει πληθώρα διαφορετικών αλγορίθμων σε αυτή την κατηγορία. Βασικό τους πλεονέκτημα είναι ότι δε χρειάζεται να εξετάσουν τα δεδομένα πολλές φορές, κι έτσι ενδείκνυνται για τη συσταδοποίηση μεγάλου όγκου δεδομένων.
- **Αλγόριθμοι συσταδοποίησης υποχώρου (Subspace clustering algorithms):** Αντιμετωπίζουν τα προβλήματα που προκύπτουν από τη μεγάλη διαστατικότητα των δεδομένων, ειδικά σε περιπτώσεις που ο χώρος των γνωρισμάτων μπορεί να είναι μερικών εκατοντάδων ή χιλιάδων διαστάσεων.
- **Αλγόριθμοι πυρήνα (Kernel-based algorithms):** Κάνουν χρήση συναρτήσεων πυρήνα ώστε να απεικονίσουν τον αρχικό χώρο γνωρισμάτων σε έναν χώρο μεγαλύτερων διαστάσεων και να υπολογίσουν τις όποιες αποστάσεις μέσω εσωτερικών γινομένων, κι όχι άμεσα, αποφεύγοντας έτσι επίπονους υπολογισμούς (“kernel trick”).

Στην παρούσα εργασία συγκεκριμένα θα χρησιμοποιήσουμε τον αλγόριθμο συσταδοποίησης k -means που βασίζεται σε βελτιστοποίηση συνάρτησης κόστους.

5.4.2.1. Ο Αλγόριθμος k -means (ή c -means, ή IsoData)

Ο αλγόριθμος k -means (ή αλλιώς c -means ή ISODATA), προτάθηκε αρχικά από τον *Stuart Lloyd* το 1957 (61) ως μια τεχνική για παλμοκωδική διαμόρφωση σήματος (γι' αυτό και συχνά αποκαλείται επίσης «αλγόριθμος του *Lloyd*»). Μια δεκαετία αργότερα, ο ίδιος

αλγόριθμος παρουσιάστηκε παράλληλα σε δύο διαφορετικές δημοσιεύσεις: των *G. H. Ball* και *D. J. Hall* που τον ονόμασαν *ISODATA* (62) και του *James MacQueen* που του έδωσε το όνομα *k-means* (63).

Αποτελεί έναν από τους πιο δημοφιλείς αλγορίθμους συσταδοποίησης, αφού χάρη στην απλότητα και την αποτελεσματικότητά του ενδείκνυται για το χειρισμό μεγάλου όγκου δεδομένων, ενώ παράλληλα βρίσκει εφαρμογή σε πάρα πολλά πεδία. Ήδη στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν ποικίλες δημοσιεύσεις και προτάσεις για επέκταση των δυνατοτήτων του με χρήση διαφόρων προχωρημένων τεχνικών.

Ο αλγόριθμος *k-means* ανήκει στην κατηγορία των μεθόδων που βασίζονται στη βελτιστοποίηση μιας καλά ορισμένης συνάρτησης κόστους και ο απώτερος στόχος του είναι η εύρεση συμπαγών συστάδων μέσα στο σύνολο δεδομένων. Κάνει χρήση αυστηρής συσταδοποίησης, που σημαίνει ότι για κάθε χρονική στιγμή κάθε σημείο της εισόδου μπορεί να ανήκει το πολύ σε μία συστάδα. Πιο αναλυτικά, έστω ότι έχουμε επιλέξει να μελετήσουμε M γνωρίσματα (features) για ένα συγκεκριμένο πρόβλημα, κι έτσι έχει προκύψει το σύνολο δεδομένων $X = \{x_1, x_2, \dots, x_N\}$, όπου κάθε x_i αποτελεί ένα διάνυσμα γνωρισμάτων M διαστάσεων. Τροφοδοτούμε τα δεδομένα στον αλγόριθμο, μαζί με ένα πλήθος συστάδων k που έχουμε επιλέξει. Έπειτα, ο *k-means* επιλέγει τυχαία τα κέντρα θ_j , $j = 1, 2, \dots, k$, των k συστάδων, και σε κάθε επανάληψη: α) ορίζει κάθε πρότυπο x_i στη συστάδα με το κοντινότερο σε αυτό κέντρο και β) επαναυπολογίζει κάθε κέντρο θ_j ως το μέσο όρο των διανυσμάτων x_i που ανήκουν στη j -στή συστάδα. Ο αλγόριθμος τερματίζει όταν δεν υπάρχει πια καμία αλλαγή στα κέντρα θ_j .

Παρατηρούμε λοιπόν ότι ο *k-Means* χρησιμοποιεί το μέσο διάνυσμα θ_j ως αντιπρόσωπο κάθε συστάδας, μέσω της σχέσης:

$$\theta_j = \frac{1}{|C_j|} \sum_{i \in C_j} x_i, \text{ Εξίσωση 21, όπου } |C_j| \text{ το πλήθος των στοιχείων της } j\text{-στής συστάδας.}$$

Παράλληλα η συνάρτηση κόστους J που επιχειρεί να βελτιστοποιήσει ο αλγόριθμος είναι μια μετρική απόστασης (τυπικά η ευκλείδεια απόσταση) ανάμεσα στο εκάστοτε διάνυσμα x_i και τον αντιπρόσωπο θ_j της συστάδας στην οποία τελικά θα τοποθετηθεί, δηλαδή:

$$J(\theta) = \sum_{j=1}^k \sum_{i \in C_j} \|x_i - \theta_j\|^2, \text{ Εξίσωση 22 και η ανάθεση του διανύσματος } x_i \text{ στη συστάδα } C_j$$

γίνεται μέσω του κανόνα:

$$C_j = \left\{ x_i : \|x_i - \theta_j\|^2, \|x_i - \theta_p\|^2, \forall j, p, j \neq p, 1, \dots, k, 1, \dots, j, k \right\}, \text{ Εξίσωση 23.}$$

Η ακριβής λειτουργία του αλγορίθμου περιγράφεται στον παρακάτω ψευδοκώδικα:

Αλγόριθμος k-Means

Είσοδος:

- Δεδομένα εισόδου x_1, x_2, \dots, x_N
- Πλήθος συστάδων k

Έξοδος:

- Συστάδες C_1, C_2, \dots, C_k

Μέθοδος:

- $C_1 = C_2 = \dots = C_k = \emptyset$
- Αρχικοποίησε τα κέντρα $\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_k$ σε τυχαίες τιμές
- Επανάλαβε {
 - Για $i = 1$ έως N {
 - Υπολόγισε τον κοντινότερο αντιπρόσωπο θ_j του x_i
 - $C_j = C_j \cup x_i$
 - }

Για $j = 1$ έως k {

 Όρισε το θ_j ως το μέσο όρο των διανυσμάτων x_i που ανήκουν στη συστάδα j

}

} Μέχρι να μην υπάρξει καμία αλλαγή στα κέντρα θ_j

Πολυπλοκότητα: $O(Nkq)$, όπου N το πλήθος των στοιχείων εισόδου, k το πλήθος των συστάδων και q το πλήθος των επαναλήψεων που απαιτείται για σύγκλιση του αλγορίθμου.

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του *k-means* είναι ότι δεν συγκλίνει απαραίτητα στο ολικό ελάχιστο της συνάρτησης κόστους, αλλά τις περισσότερες φορές εγκλωβίζεται σε τοπικά ελάχιστα. Το γεγονός αυτό μπορεί εν μέρει να αντιμετωπιστεί με διαδοχικές εκτελέσεις του αλγορίθμου και προβολή τελικά του καλύτερου αποτελέσματος. Στην πράξη η συσταδοποίηση που επιτυγχάνει ο *k-means* είναι αρκετά καλή και προσεγγίζει ικανοποιητικά τη βέλτιστη λύση. Αξίζει να σημειωθεί ότι το πρόβλημα συσταδοποίησης που καλείται να επιλύσει ο *k-means* ανήκει στην κλάση NP-hard (64), επομένως επιδέχεται επίλυση μόνο μέσω ευριστικών μεθόδων.

Είναι επίσης προφανές ότι η ποιότητα των συστάδων που εντοπίζει ο αλγόριθμος εξαρτάται άμεσα και από τις αρχικές τιμές που αναθέτει στα κέντρα θ_j , αφού με διαφορετική αρχικοποίησή τους τα αποτελέσματα μπορεί να ποικίλλουν σημαντικά. Για το σκοπό αυτό έχει προταθεί μια παραλλαγή του *k-means* με την ονομασία *k-means++* (65), ο οποίος διαθέτει μια βελτιστοποιημένη τεχνική αρχικοποίησης των κέντρων και παρουσιάζεται συνοπτικά παρακάτω:

1. Επιλέγεται τυχαία ένα κέντρο θ_1 από τα δεδομένα, θεωρώντας ομοιόμορφη κατανομή.
2. Για κάθε διάνυσμα x_i υπολογίζεται η απόστασή του $D(x_i)$ από το κοντινότερο κέντρο.
3. Επιλέγεται ένα κέντρο θ_j από τα δεδομένα, με πιθανότητα επιλογής του κάθε x_i ανάλογη της $D(x_i)^2$.
4. Τα βήματα 2-3 επαναλαμβάνονται μέχρι να επιλεγούν k κέντρα.
5. Στη συνέχεια εφαρμόζεται ο κλασικός *k-means* αλγόριθμος.

Ένα ακόμη ζήτημα που πρέπει να ληφθεί υπ' όψη πριν τη χρήση του *k-means* είναι η εύρεση μιας κατάλληλης τιμής του k για να δοθεί ως είσοδος στον αλγόριθμο. Έχουν κατά καιρούς προταθεί διάφορες μέθοδοι για την απομόνωση “καλών” τέτοιων τιμών που θα αποφέρουν ποιοτικές συστάδες και στην παρούσα εργασία θα γίνει χρήση της μετρικής $f(K)$ όπως περιγράφεται στην αντίστοιχη δημοσίευση των *Pham, Dimon* και *Nguyen* (2005) (66). Η επιλογή αυτή έγινε λόγω της σχετικά μικρής πολυπλοκότητας της μεθόδου και της αποτελεσματικότητάς της ακόμη και σε μεγάλο όγκο δεδομένων. Πιο συγκεκριμένα, ορίζεται η *παραμόρφωση* (*distortion*) ως ένα μέτρο της απόστασης ανάμεσα στα στοιχεία της συστάδας και το κέντρο της:

$$I_j = \sum_{x_i \in C_j} \|x_i - \theta_j\|^2, \text{ Εξίσωση 24.}$$

Ο συνολικός αντίκτυπος των παραμορφώσεων όλων των συστάδων για δεδομένη τιμή του k δίνεται από τη σχέση:

$$S_k = \sum_{j=1}^k I_j, \text{ Εξίσωση 25.}$$

Οι συγγραφείς καταλήγουν στον εξής ορισμό:

$$f(K) = \begin{cases} 1, & \alpha \vee K = 1 \\ \frac{S_K}{\alpha_K S_{K-1}}, & \alpha \vee S_{K-1} \neq 0, \forall K > 1, \text{ Εξίσωση 26.} \\ 1, & \alpha \vee S_{K-1} = 0, \forall K > 1 \end{cases}$$

$$\alpha_K = \begin{cases} 1 - \frac{3}{4N_d}, & \text{αν } K = 2 \text{ και } N_d > 1 \\ \alpha_{K-1} + \frac{1 - \alpha_{K-1}}{6}, & \text{αν } K > 2 \text{ και } N_d > 1 \end{cases}, \text{ Εξίσωση 27. Όπου } N_d: \text{ οι διαστάσεις του χώρου}$$

δεδομένων και a_K : συντελεστής βάρους.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η συνάρτηση $f(K)$ που ορίσαμε αποτελεί το λόγο της πραγματικής προς την εκτιμώμενη παραμόρφωση, κι επομένως η τιμή της ελαττώνεται όταν υπάρχουν περιοχές στο χώρο δεδομένων μας με υψηλή πυκνότητα. Έτσι λοιπόν μπορούμε να υπολογίσουμε τη μετρική αυτή για διάφορες τιμές του k , να επιλέξουμε εκείνες για τις οποίες η $f(K)$ αποκτά τη μικρότερη τιμή, κι εν τέλει να αποφασίσουμε για την καταλληλότερη από αυτές με εποπτεία της συσταδοποίησης που προκύπτει.

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο k -means είναι ευαίσθητος στο θόρυβο και την ύπαρξη ακραίων τιμών στα δεδομένα (*outliers*). Αν κατά την εκτέλεσή του βρεθεί αντιμέτωπος με κάποια ακραία τιμή, τότε αναπόφευκτα θα την αναθέσει σε κάποια συστάδα, επηρεάζοντας άμεσα την τιμή του αντίστοιχου κέντρου κι επομένως την ποιότητα της τελικής συσταδοποίησης. Για το λόγο αυτό ενδείκνυται να γίνεται κατάλληλη κανονικοποίηση των δεδομένων πριν από τη χρήση τους ή/και απομάκρυνση του θορύβου όπου είναι εφικτό.

5.4.3. Λογισμικό Ανάλυσης Δεδομένων

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του προγράμματος MATLAB (Mathworks, Natick, MA). Ειδικότερα, στο περιβάλλον αυτό έγιναν οι μετασχηματισμοί Fourier, τόσο ο DTFT όσο και ο DFT. Επίσης, η ταξινόμηση των σημάτων έγινε με τη χρήση k -means αλγορίθμου.

ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6-Η ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ *IN VITRO* ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ

Οι μετρήσεις σεροτονίνης περιελάμβαναν την εκτίμηση των επιπέδων σεροτονίνης σε διάλυμα 20μM, σε ηλεκτροχημική κυψέλη.

6.1. *In Vitro* Μέτρηση Σεροτονίνης με Ηλεκτρόδιο Άνθρακα Πολλαπλών Ινών (Multi-Fiber Electrode)

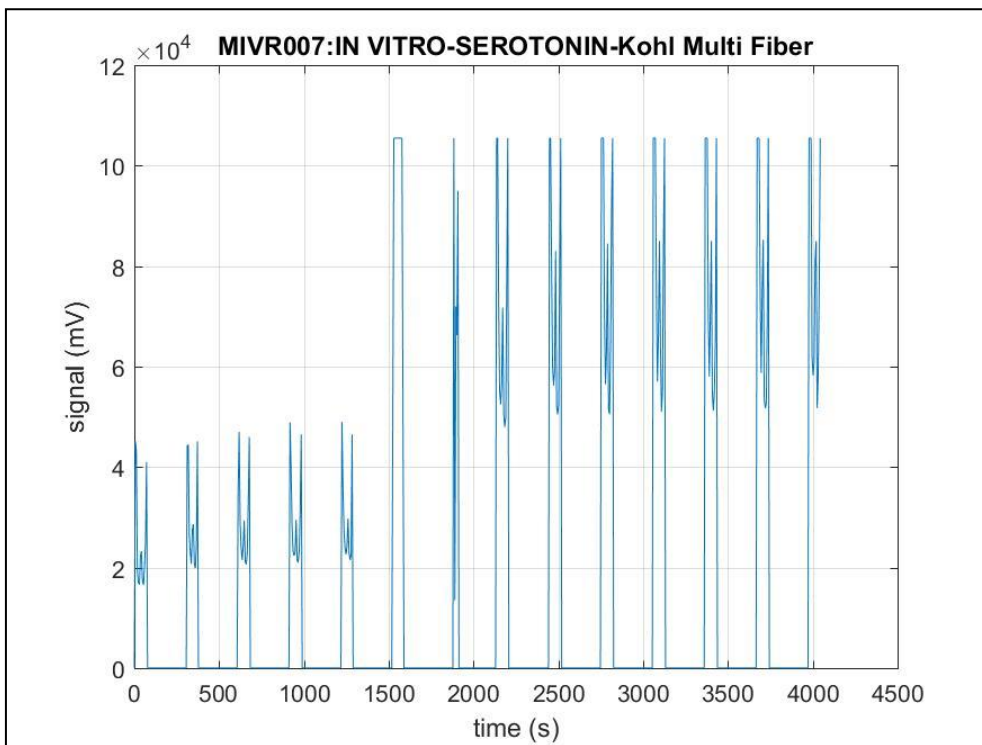
Στις παρακάτω εικόνες, παρουσιάζεται το βολταμμογράφημα από τη μέτρηση με ηλεκτρόδιο ινών άνθρακα (Εικόνα 36). Στην Εικόνα 37 παρουσιάζεται το λογαριθμημένο σήμα της μέτρησης. Επίσης, παρουσιάζονται η απόλυτη τιμή του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου (Εικόνα 38), η γωνία του μετασχηματισμού *Fourier* διακριτού χρόνου (Εικόνα 39), η απόλυτη τιμή του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 40) και η γωνία του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 41).

6.2. *In Vitro* Μέτρηση Σεροτονίνης με Ηλεκτρόδιο Άνθρακα Μίας Ίνας (Single-Fiber Electrode)

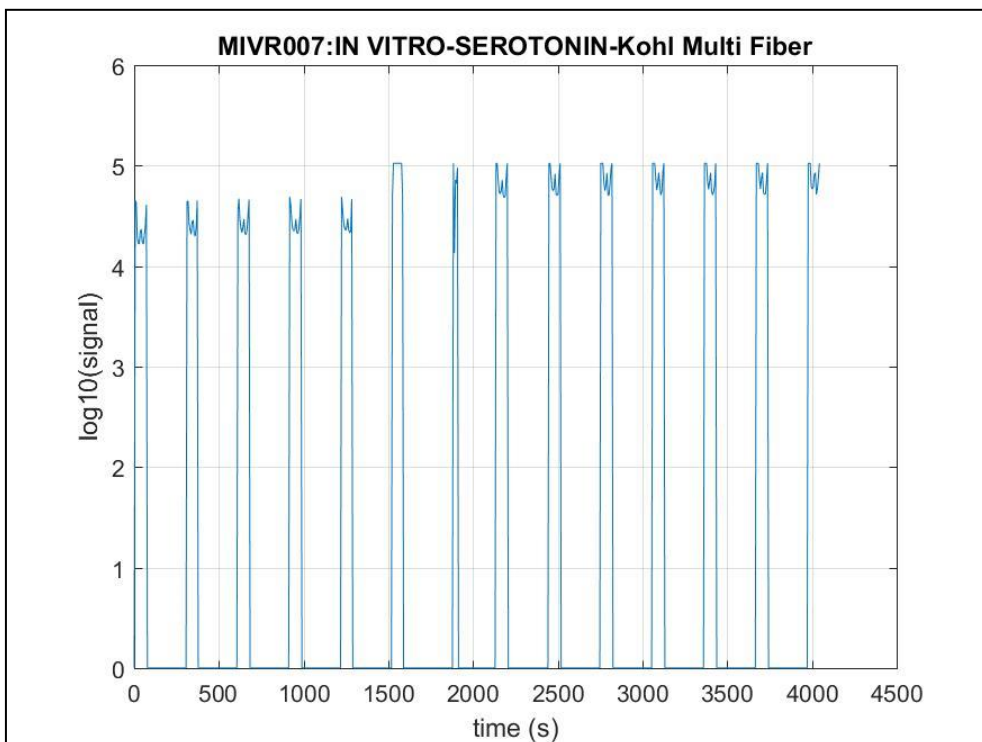
Στις παρακάτω εικόνες, παρουσιάζεται το βολταμμογράφημα από τη μέτρηση με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα (Εικόνα 42). Στην Εικόνα 43 παρουσιάζεται το λογαριθμημένο σήμα της μέτρησης. Επίσης, παρουσιάζονται η απόλυτη τιμή του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου (Εικόνα 44), η γωνία του μετασχηματισμού *Fourier* διακριτού χρόνου (Εικόνα 45), η απόλυτη τιμή του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 46) και η γωνία του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 47).

6.3. *In Vitro* Μέτρηση Σεροτονίνης με Ηλεκτρόδιο Γραφίτη (Graphite Electrode)

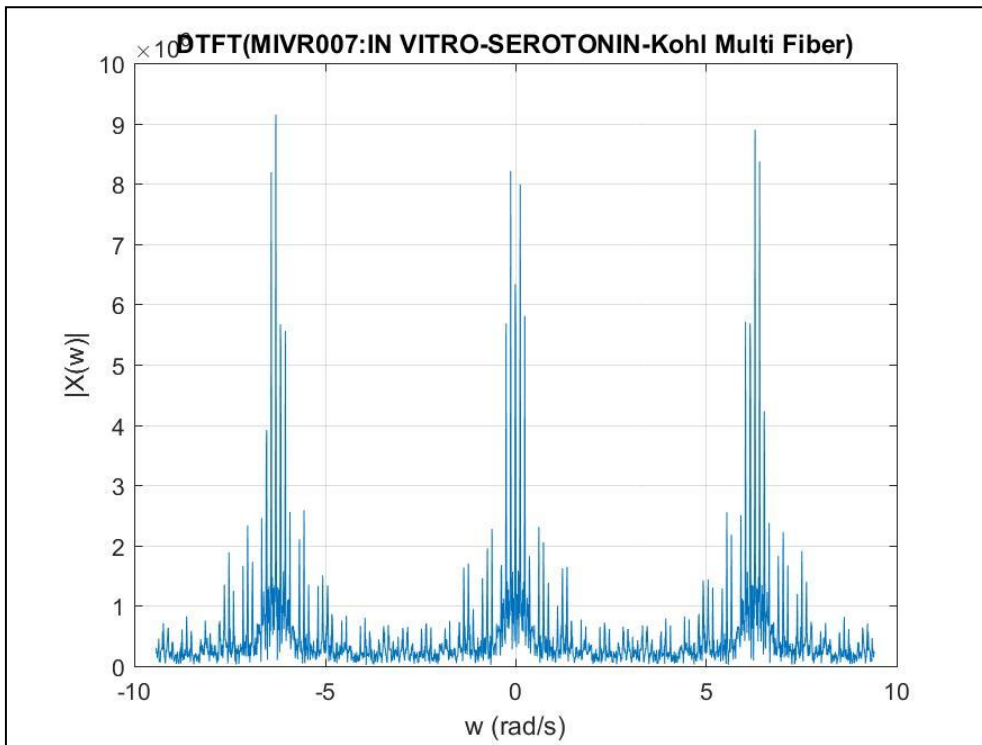
Στις παρακάτω εικόνες, παρουσιάζεται το βολταμμογράφημα από τη μέτρηση με ηλεκτρόδιο γραφίτη (Εικόνα 48). Στην Εικόνα 49 παρουσιάζεται το λογαριθμημένο σήμα της μέτρησης. Επίσης, παρουσιάζονται η απόλυτη τιμή του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου (Εικόνα 50), η γωνία του μετασχηματισμού *Fourier* διακριτού χρόνου (Εικόνα 51), η απόλυτη τιμή του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 52) και η γωνία του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 53).



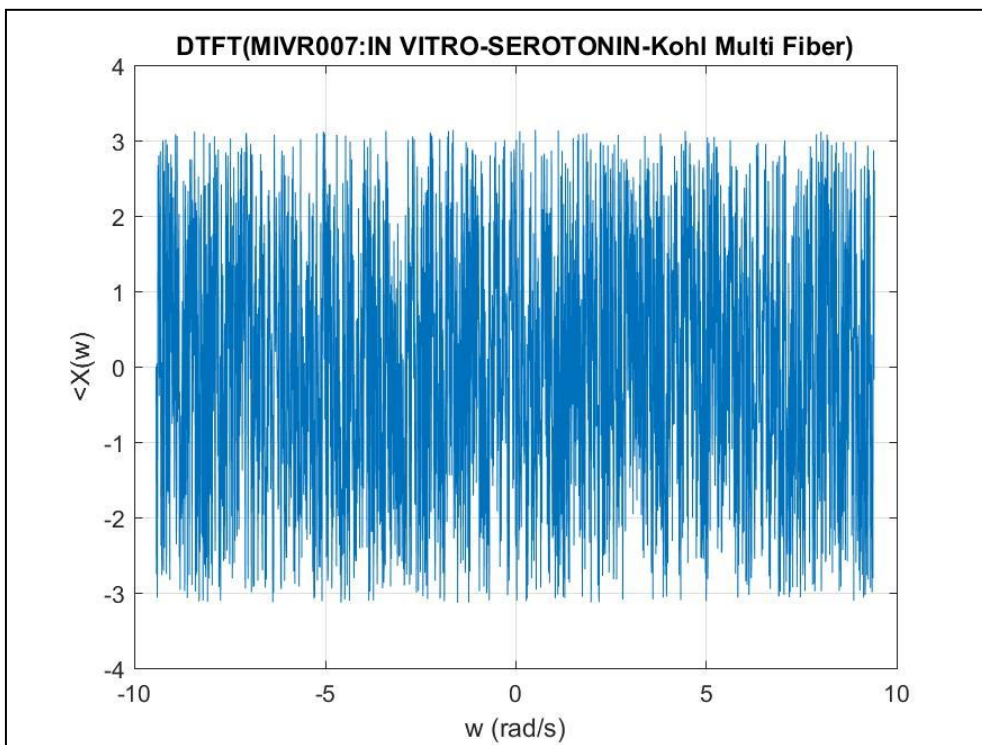
Εικόνα 36. Αναπαράσταση με Excel της μέτρησης σεροτονίνης, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ινών άνθρακα.



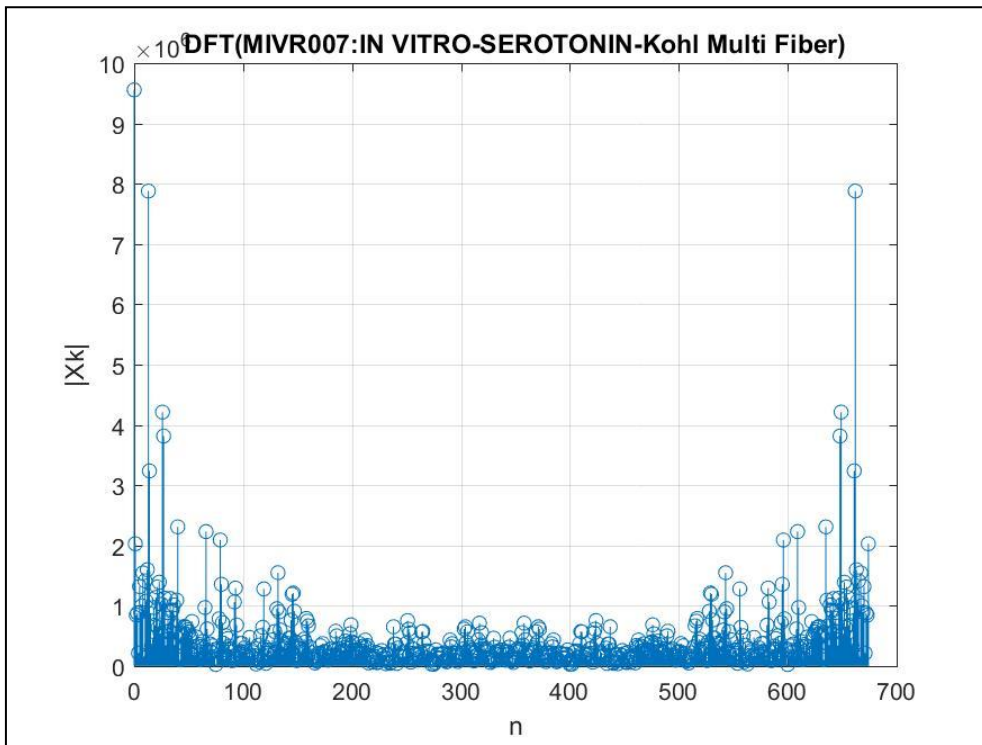
Εικόνα 37. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της μέτρησης σεροτονίνης, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ινών άνθρακα..



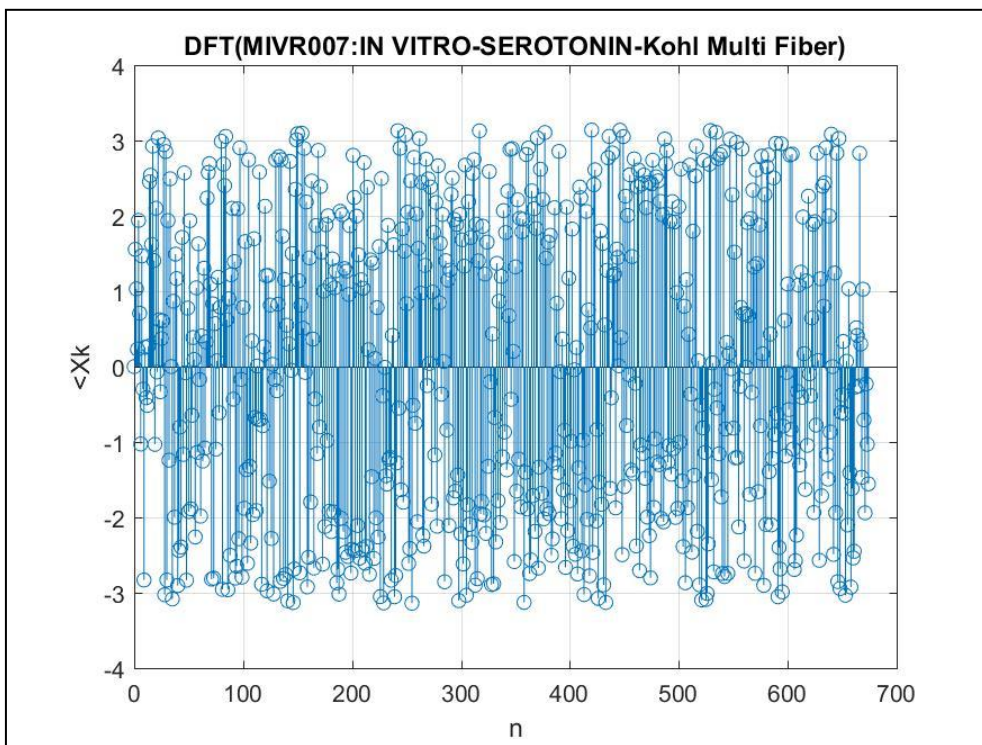
Εικόνα 38. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *in vitro* μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.



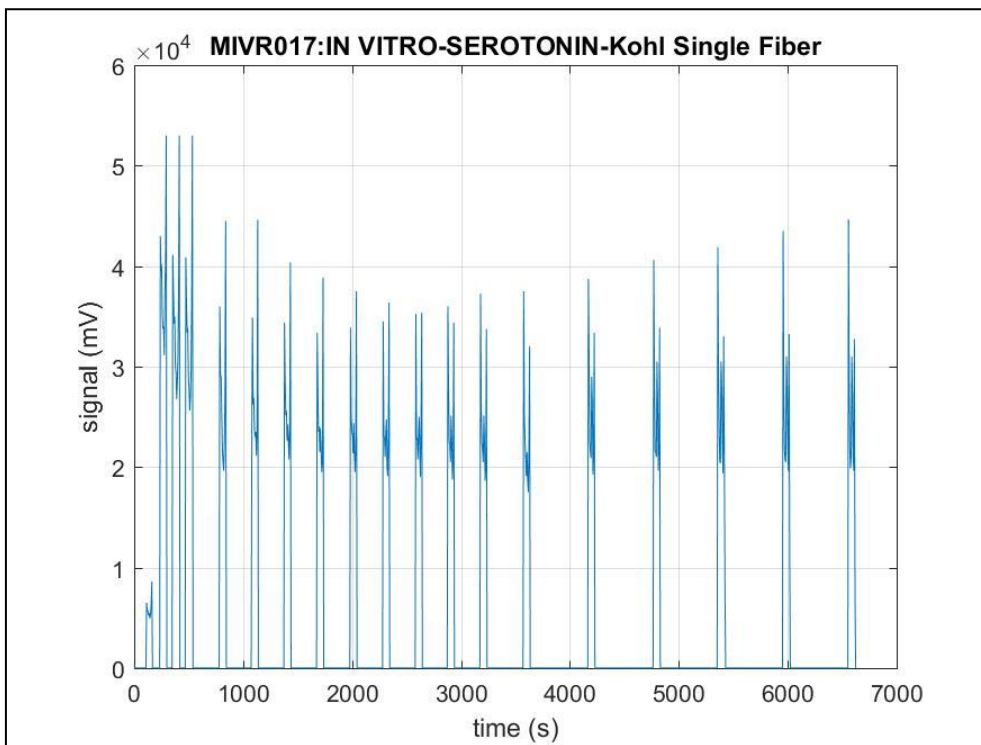
Εικόνα 39. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *in vitro* μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.



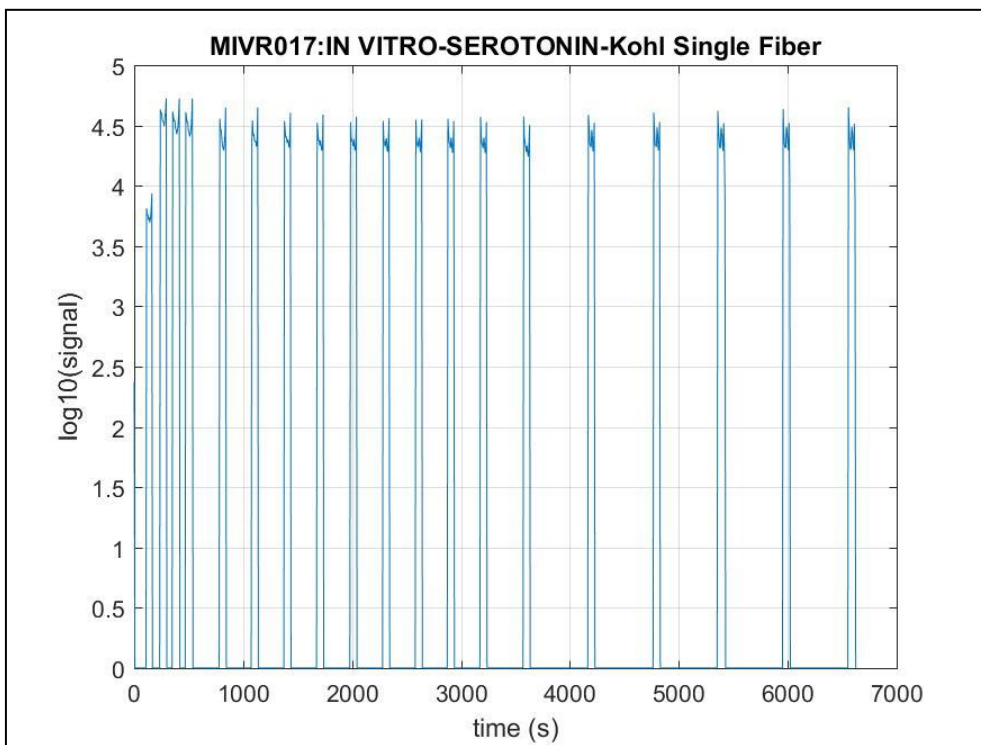
Εικόνα 40. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *in vitro* μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.



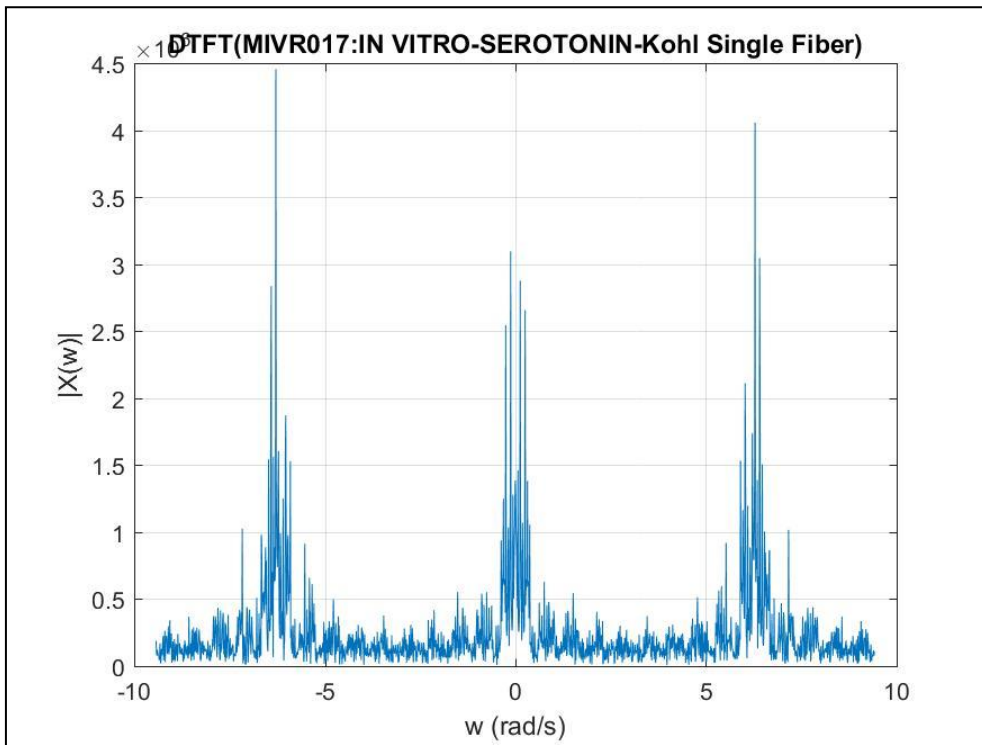
Εικόνα 41. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *in vitro* μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.



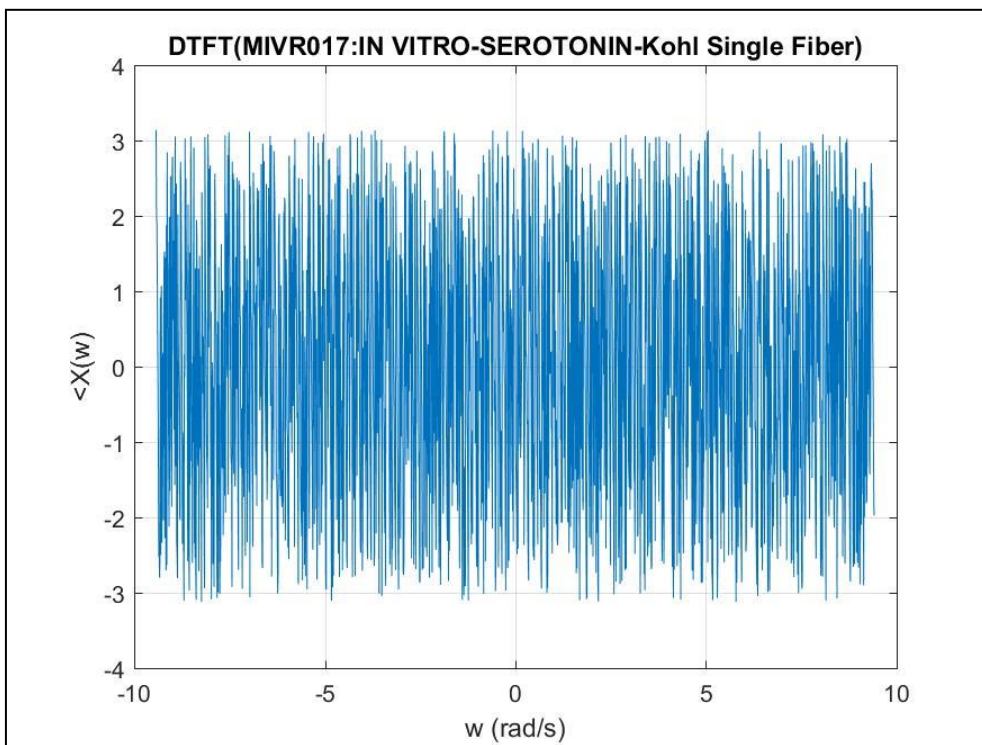
Εικόνα 42. Αναπαράσταση με Excel της μέτρησης σεροτονίνης, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.



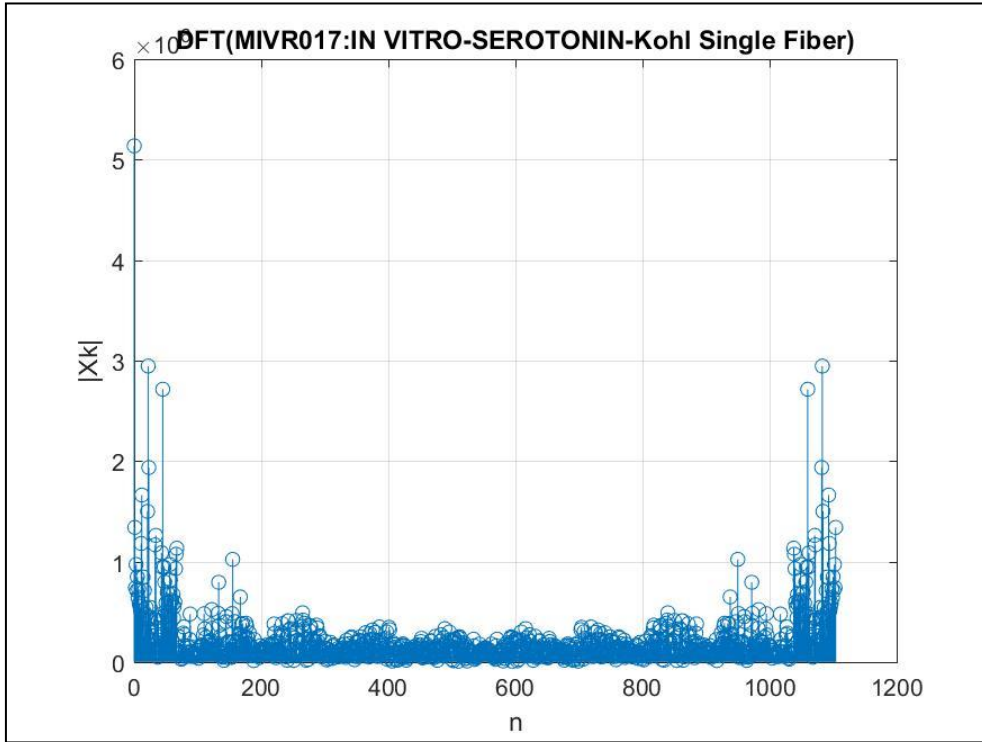
Εικόνα 43. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της μέτρησης σεροτονίνης, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα..



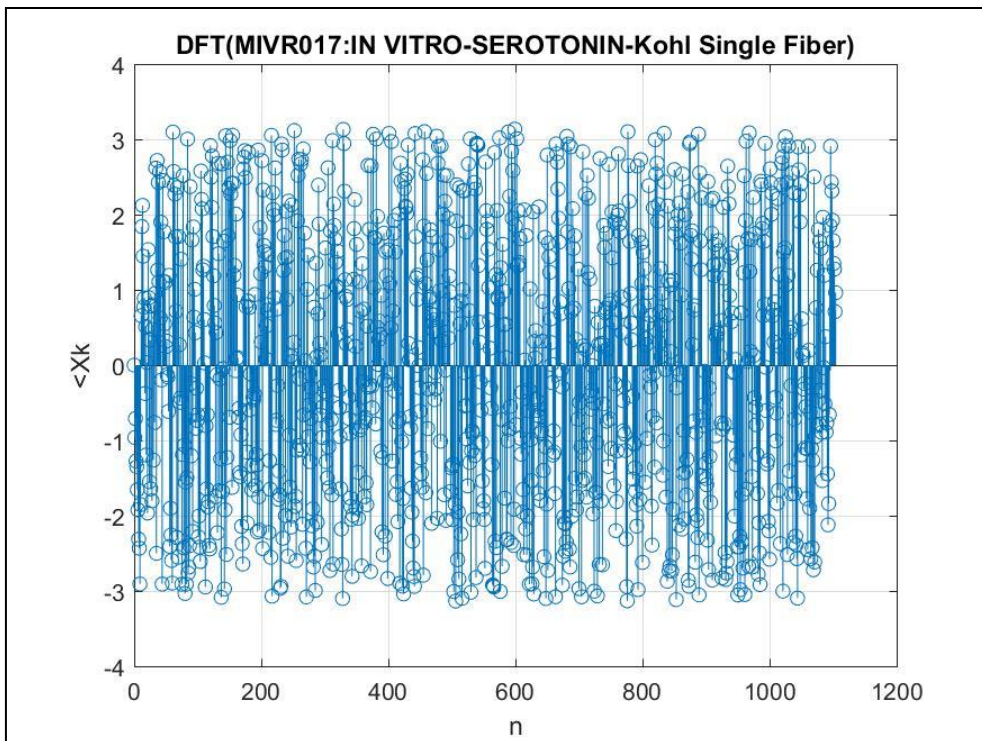
Εικόνα 44. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *in vitro* μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.



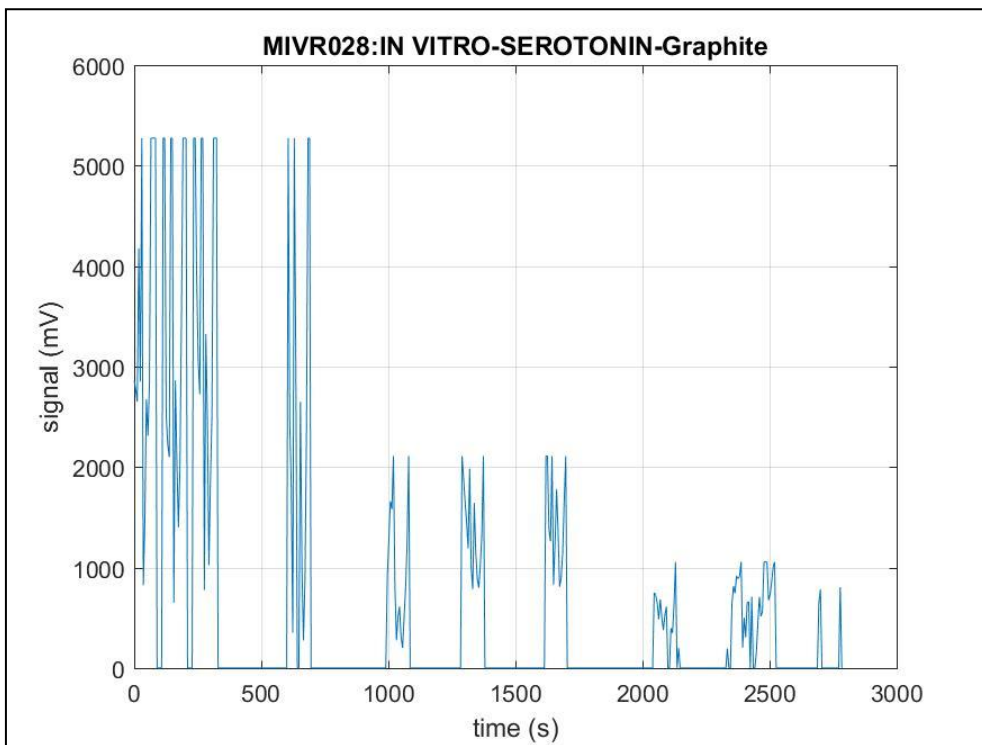
Εικόνα 45. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *in vitro* μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.



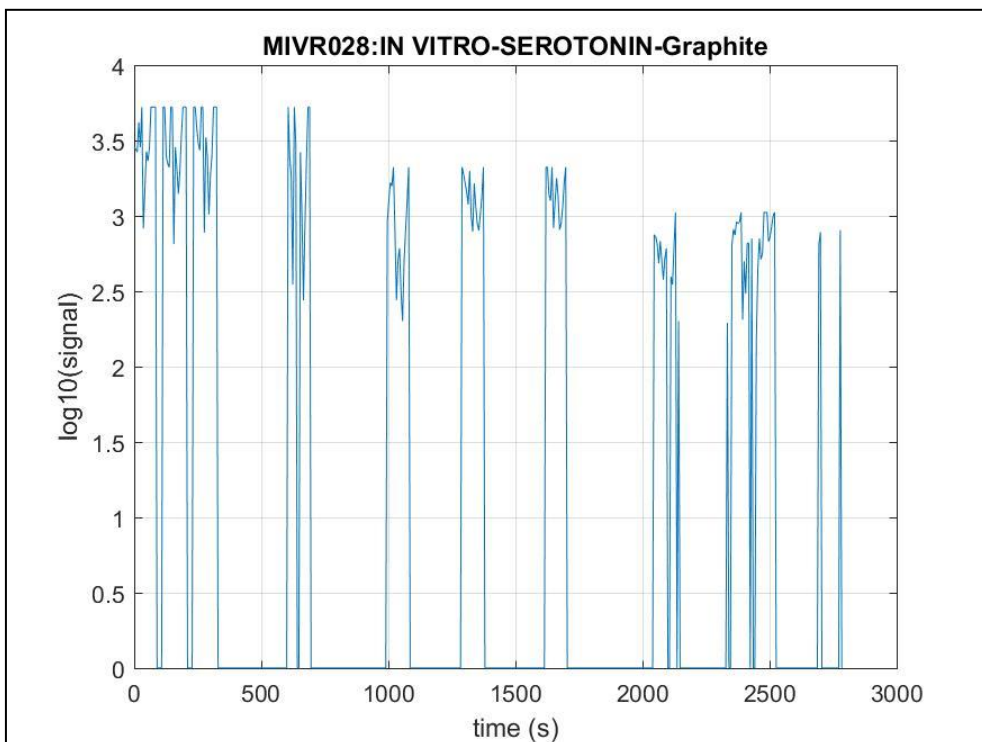
Εικόνα 46. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *in vitro* μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.



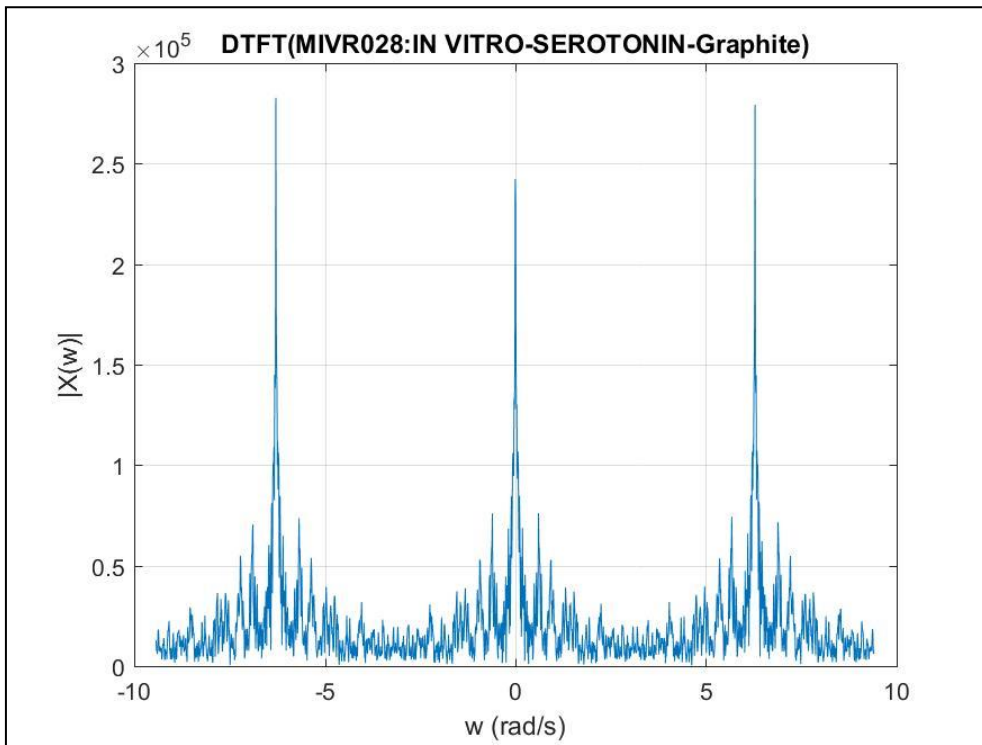
Εικόνα 47. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *in vitro* μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.



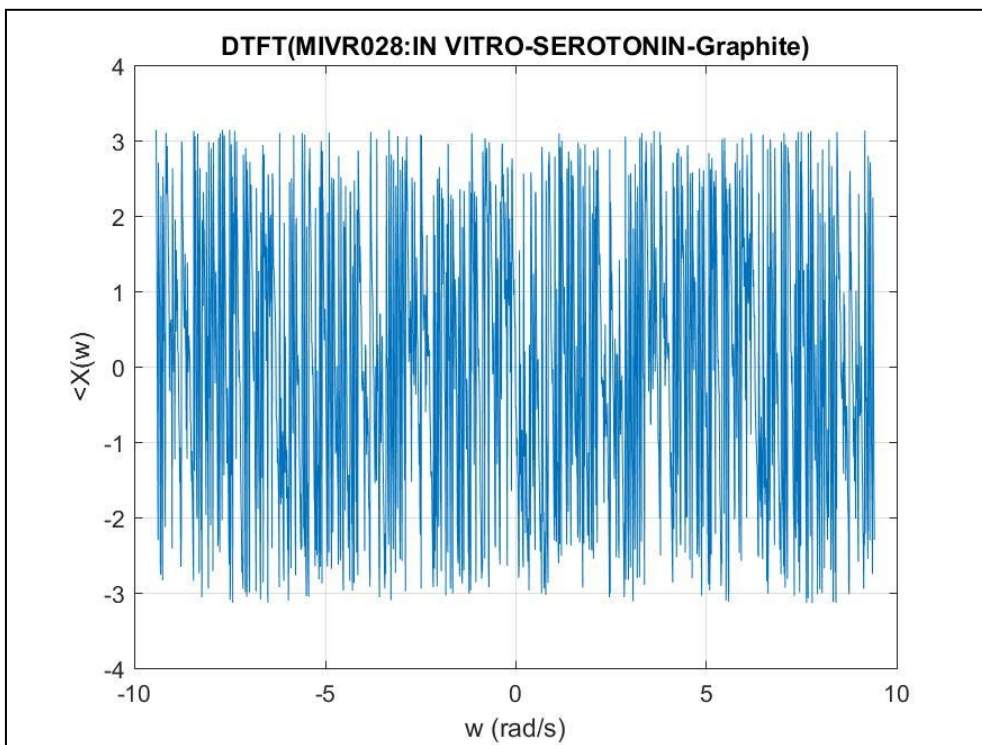
Εικόνα 48. Αναπαράσταση με Excel της μέτρησης σεροτονίνης, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



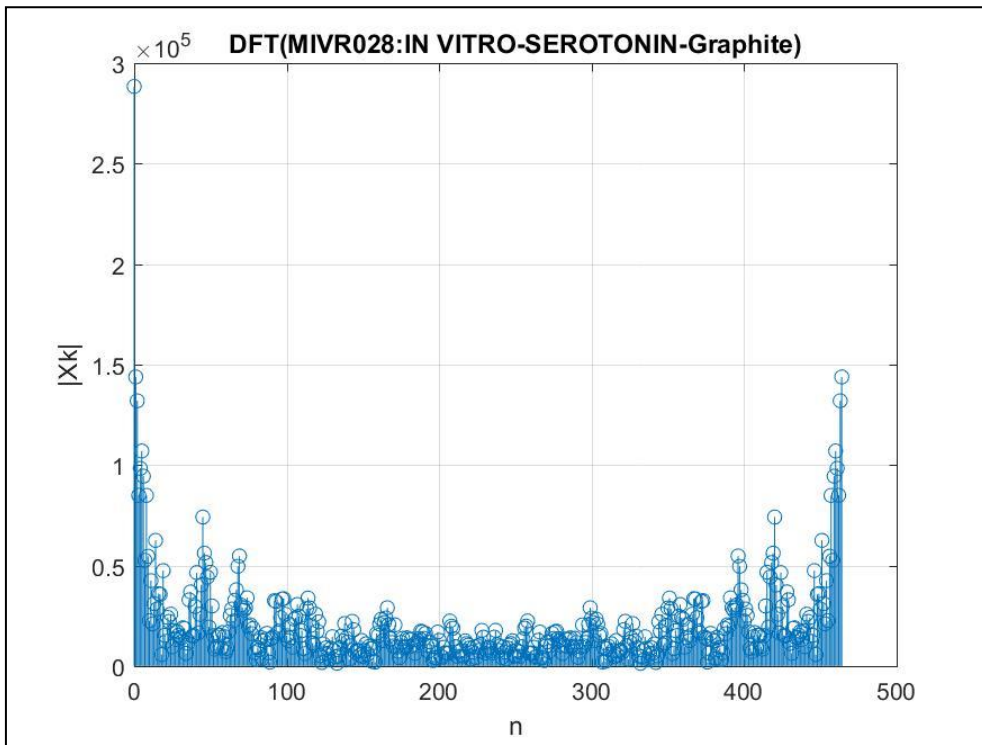
Εικόνα 49. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της μέτρησης σεροτονίνης, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



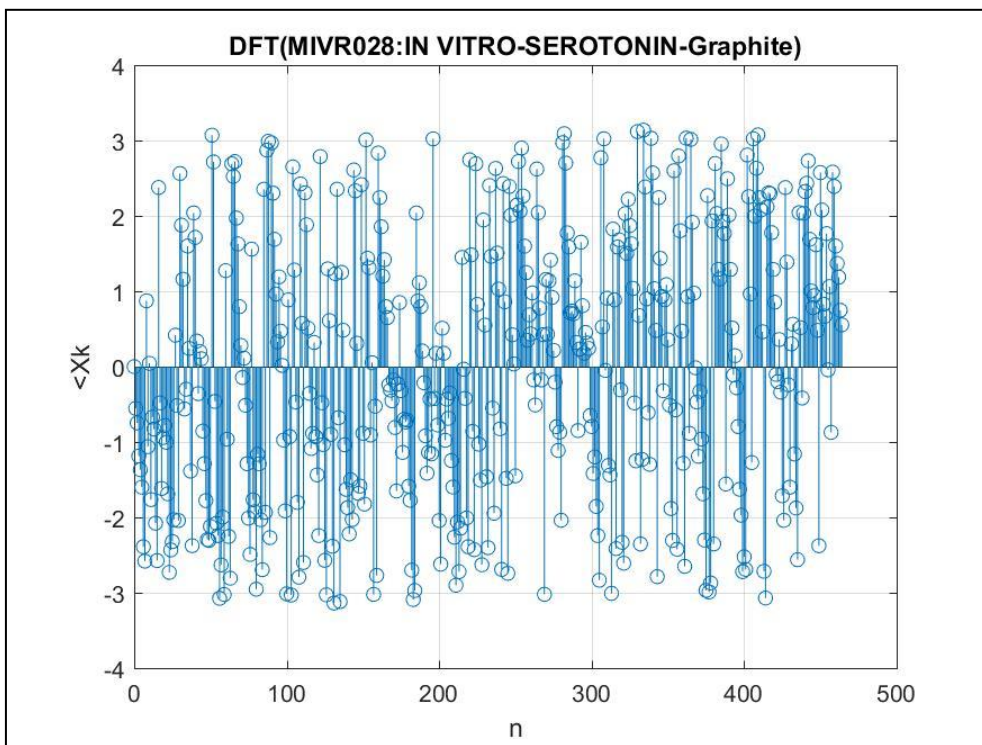
Εικόνα 50. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *in vitro* μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



Εικόνα 51. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *in vitro* μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



Εικόνα 52. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *in vitro* μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



Εικόνα 53. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *in vitro* μέτρησης σεροτονίνης με ηλεκτρόδιο γραφίτη.

7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7-Η ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ *IN VITRO* ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ 5-ΗΙΑΑ, 5-ΗΤΡ, 5-ΗΤ ΚΑΙ DOPAC

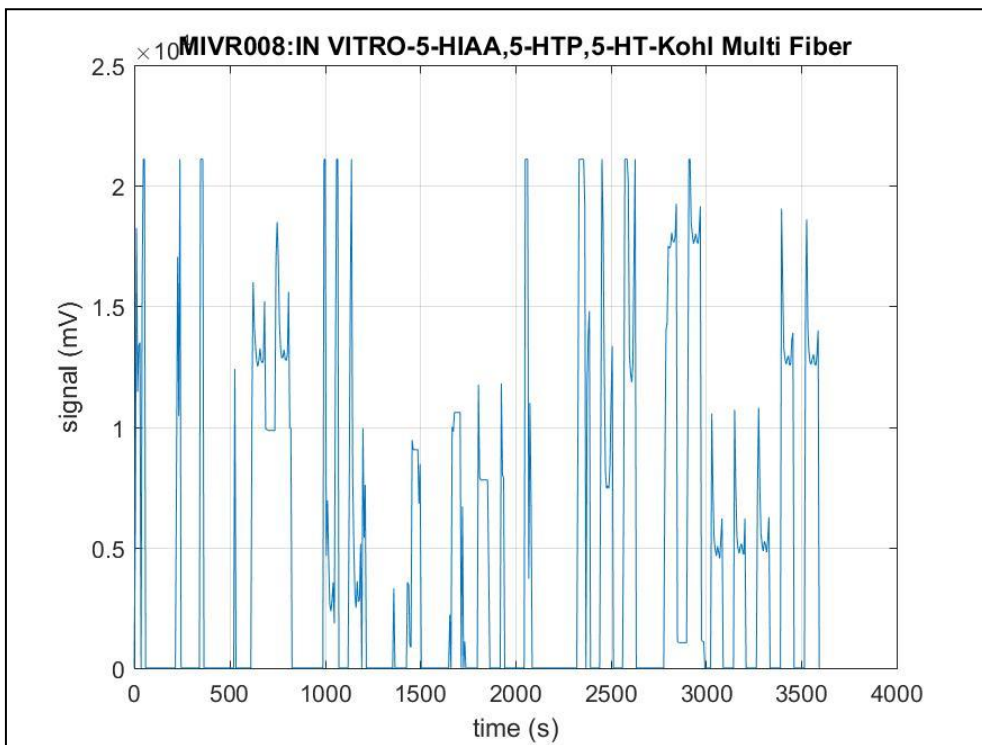
Οι μετρήσεις σεροτονίνης περιελάμβαναν την εκτίμηση των επιπέδων 5-ΗΙΑΑ (5-Hydroxy Indol Acetic Acid), 5-ΗΤΡ (5-Hydroxy Tryptophan) και Σεροτονίνης (5-ΗΤ) σε διάλυμα 20μΜ, σε ηλεκτροχημική κυψέλη.

7.1. *In Vitro* Μέτρηση των 5-ΗΙΑΑ, 5-ΗΤΡ και 5-ΗΤ με Ηλεκτρόδιο Άνθρακα Πολλαπλών Ινών (Multi-Fiber Electrode)

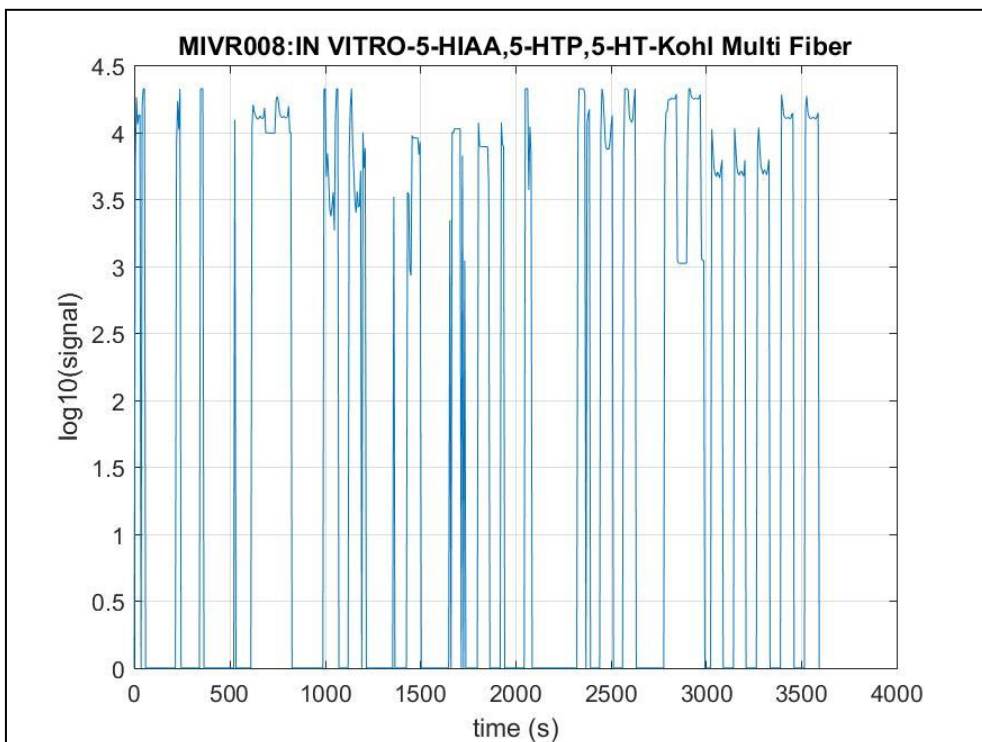
Στις παρακάτω εικόνες, παρουσιάζεται το βολταμμογράφημα από τη μέτρηση με ηλεκτρόδιο ινών άνθρακα (Εικόνα 54). Στην Εικόνα 55 παρουσιάζεται το λογαριθμημένο σήμα της μέτρησης. Επίσης, παρουσιάζονται η απόλυτη τιμή του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου (Εικόνα 56), η γωνία του μετασχηματισμού *Fourier* διακριτού χρόνου (Εικόνα 57), η απόλυτη τιμή του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 58) και η γωνία του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 59).

7.2. *In Vitro* Μέτρηση 5-ΗΙΑΑ, DOPAC και 5-ΗΤ με Ηλεκτρόδιο Γραφίτη (Graphite Electrode)

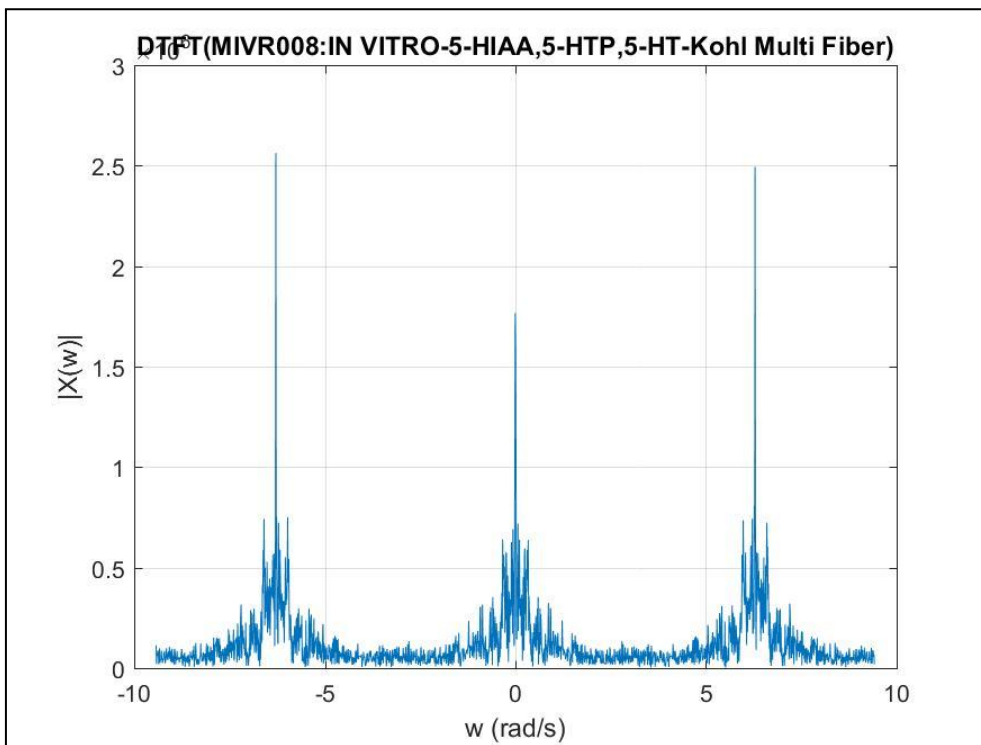
Στις παρακάτω εικόνες, παρουσιάζεται το βολταμμογράφημα από τη μέτρηση με ηλεκτρόδιο γραφίτη (Εικόνα 60). Στην Εικόνα 61 παρουσιάζεται το λογαριθμημένο σήμα της μέτρησης. Επίσης, παρουσιάζονται η απόλυτη τιμή του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου (Εικόνα 62), η γωνία του μετασχηματισμού *Fourier* διακριτού χρόνου (Εικόνα 63), η απόλυτη τιμή του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 64) και η γωνία του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 65).



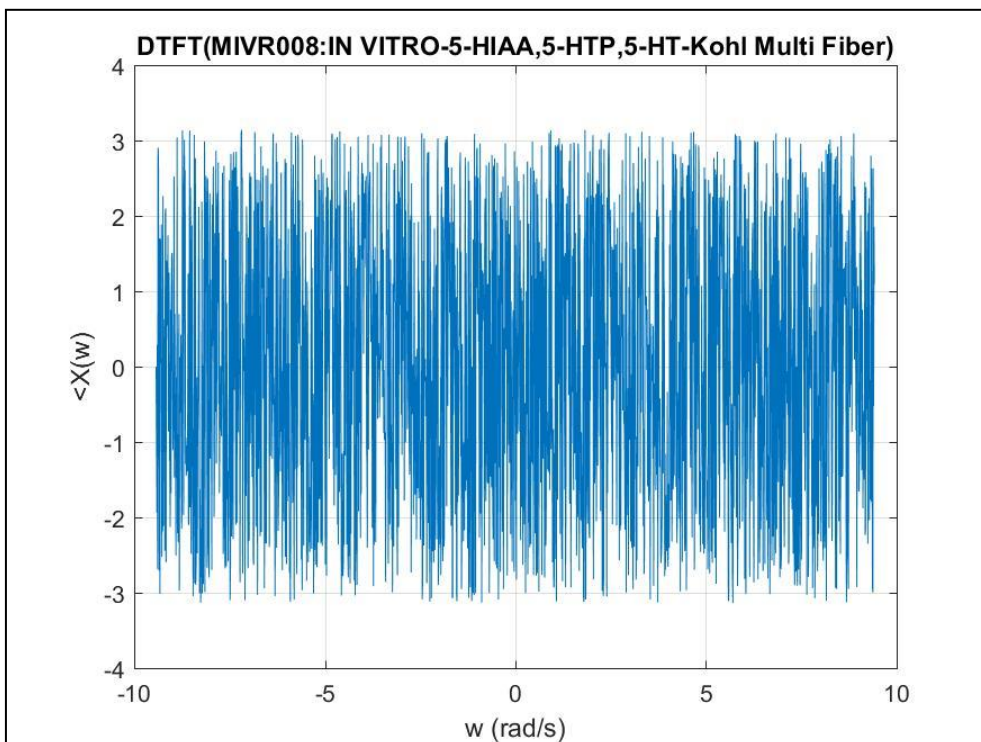
Εικόνα 54. Αναπαράσταση με Excel της μέτρησης 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.



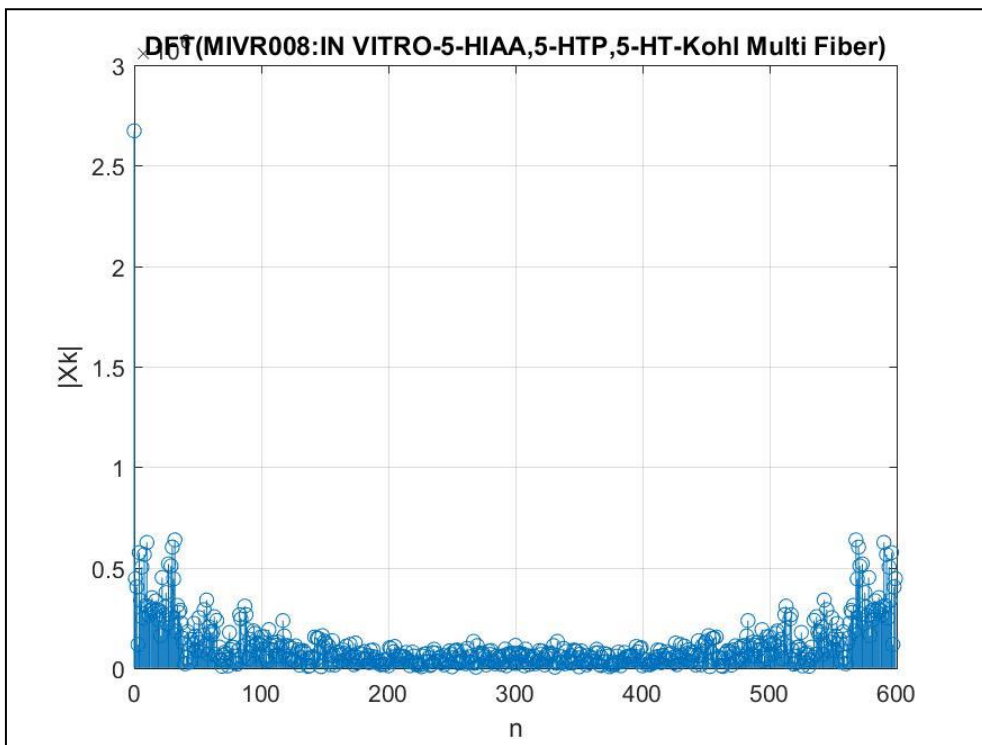
Εικόνα 55. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της μέτρησης 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.



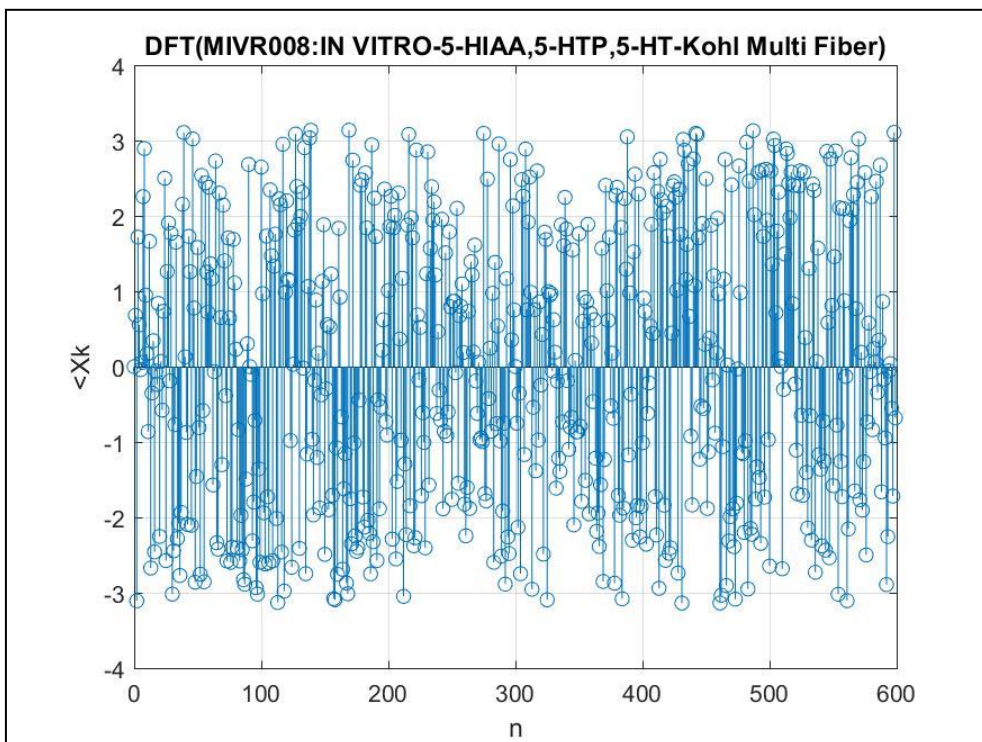
Εικόνα 56. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *in vitro* μέτρησης 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.



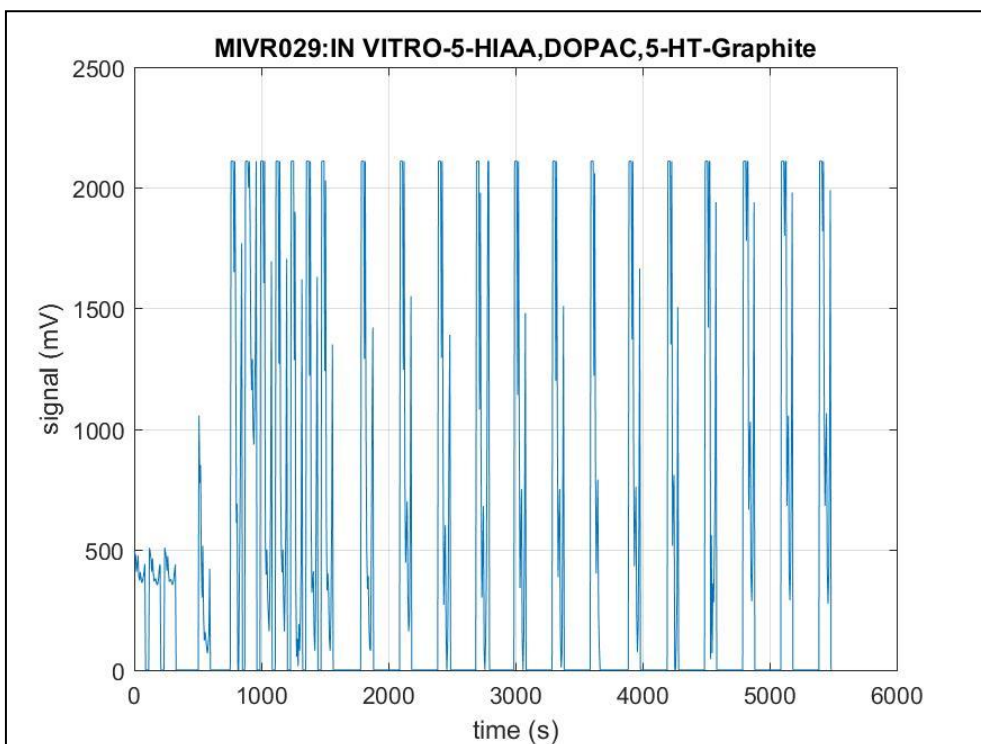
Εικόνα 57. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *in vitro* μέτρησης 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.



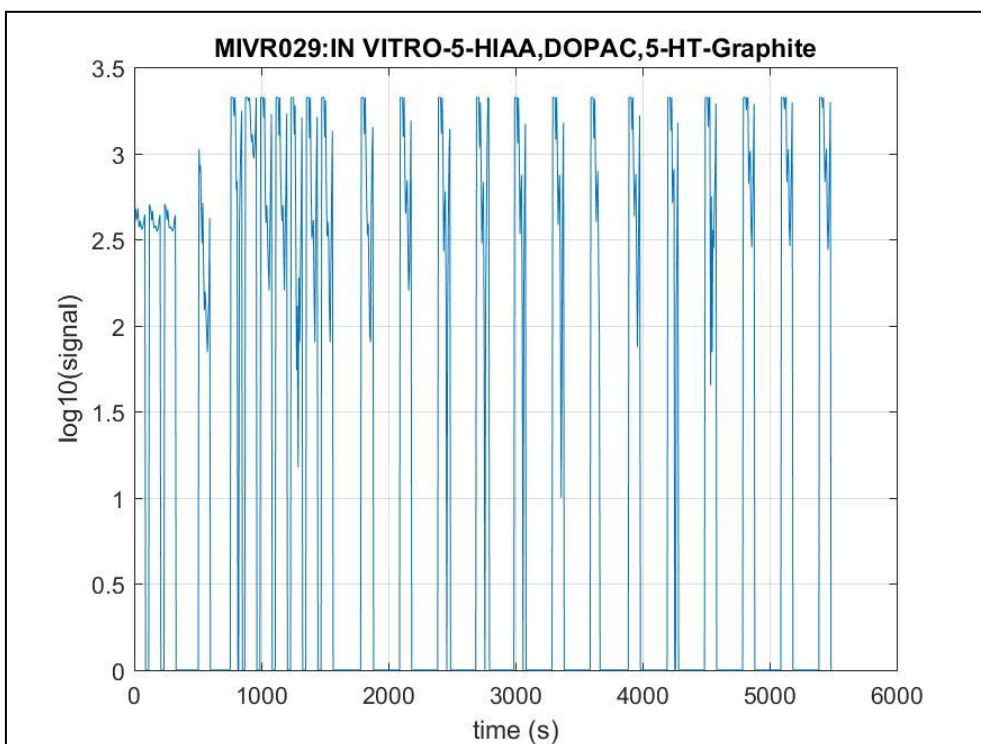
Εικόνα 58. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *in vitro* μέτρησης 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.



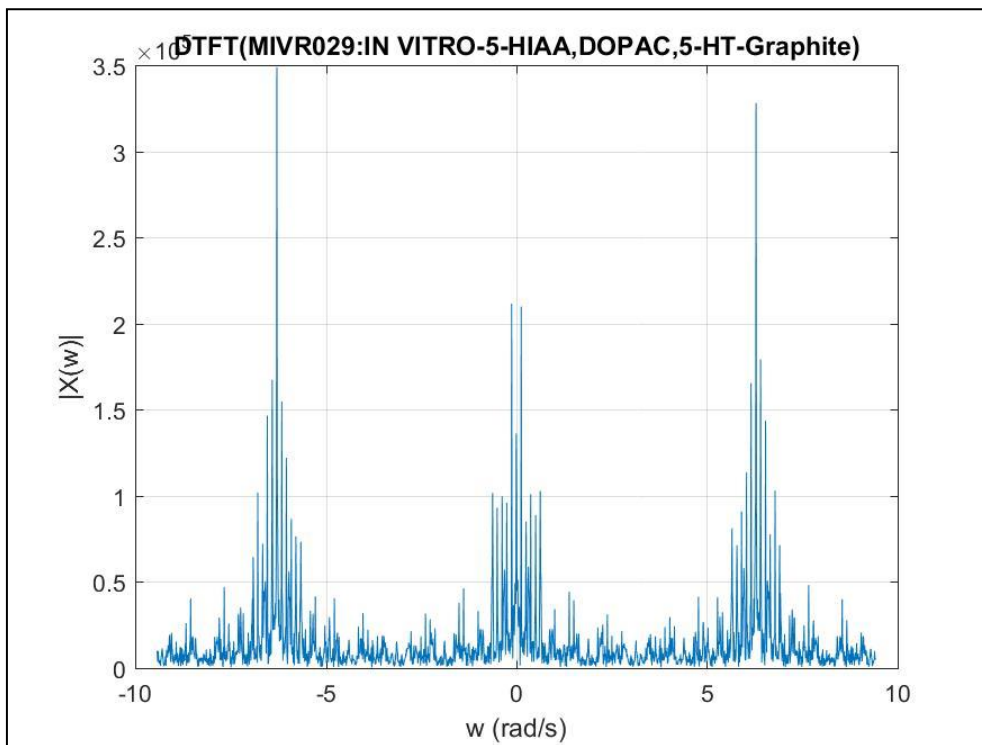
Εικόνα 59. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *in vitro* μέτρησης 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.



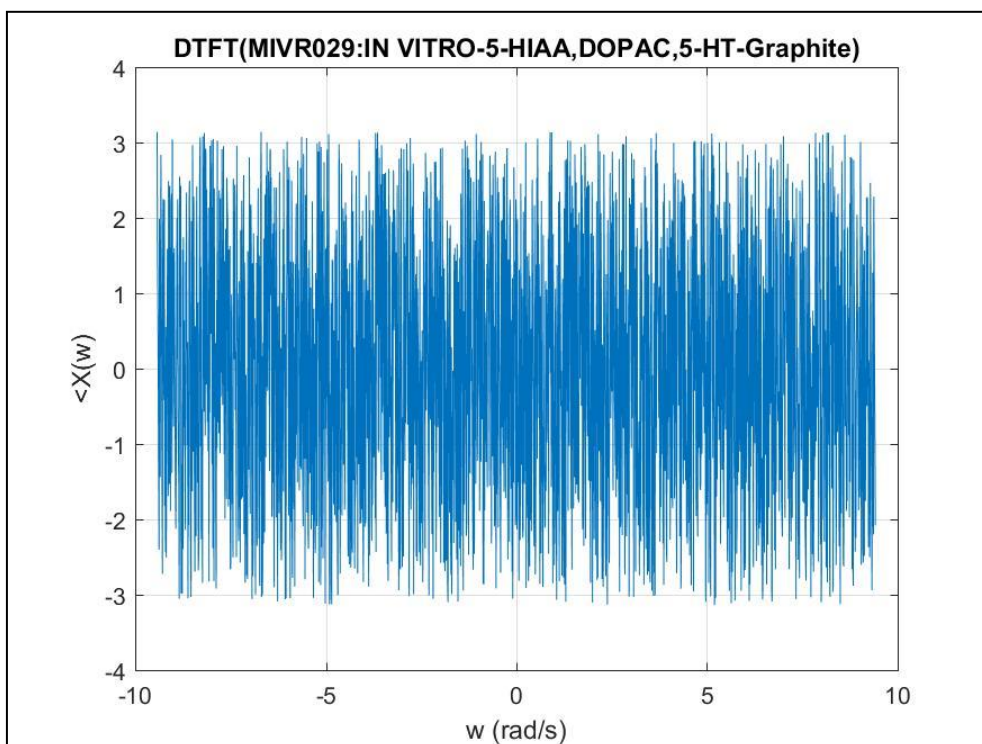
Εικόνα 60. Αναπαράσταση με Excel της μέτρησης 5-HIAA, DOPAC, 5-HT, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



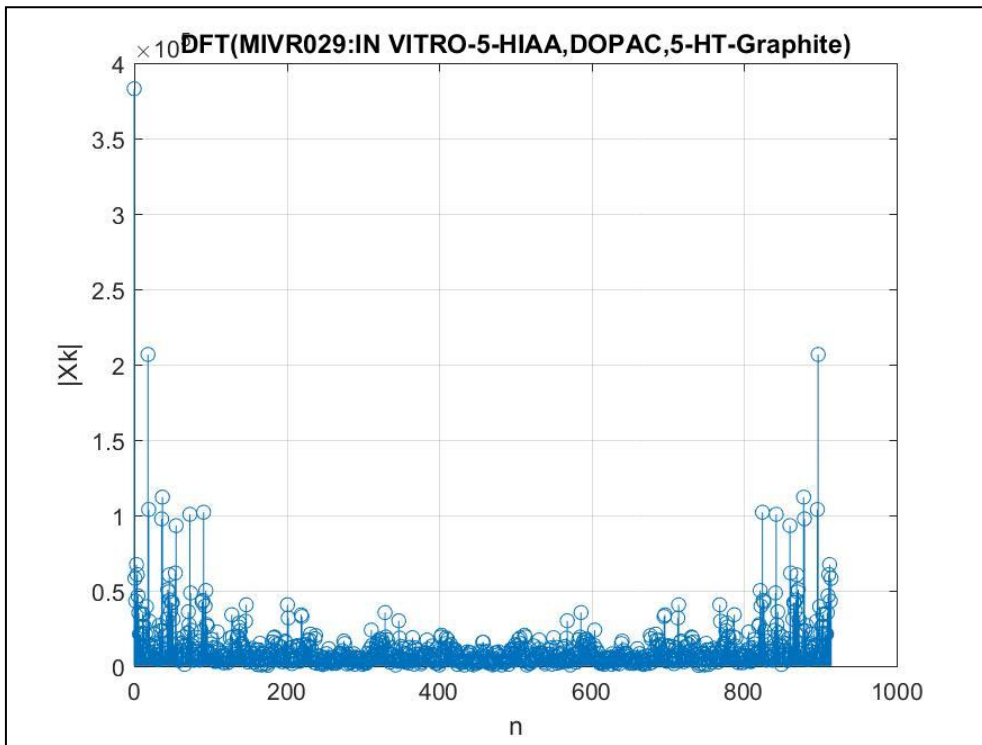
Εικόνα 61. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της μέτρησης 5-HIAA, DOPAC, 5-HT, σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



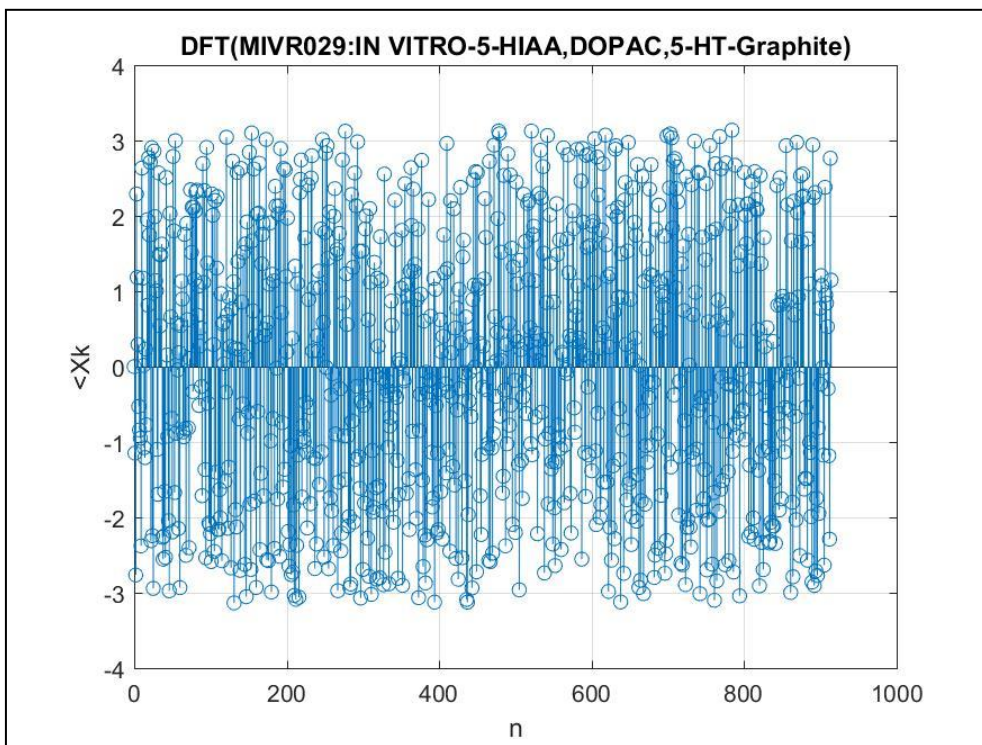
Εικόνα 62. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *in vitro* μέτρησης 5-HIAA, DOPAC, 5-HT με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



Εικόνα 63. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *in vitro* μέτρησης 5-HIAA, DOPAC, 5-HT με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



Εικόνα 64. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *in vitro* μέτρησης 5-HIAA, DOPAC, 5-HT με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



Εικόνα 65. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *in vitro* μέτρησης 5-HIAA, DOPAC, 5-HT με ηλεκτρόδιο γραφίτη.

8. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8-Η ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ *EX VIVO* ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

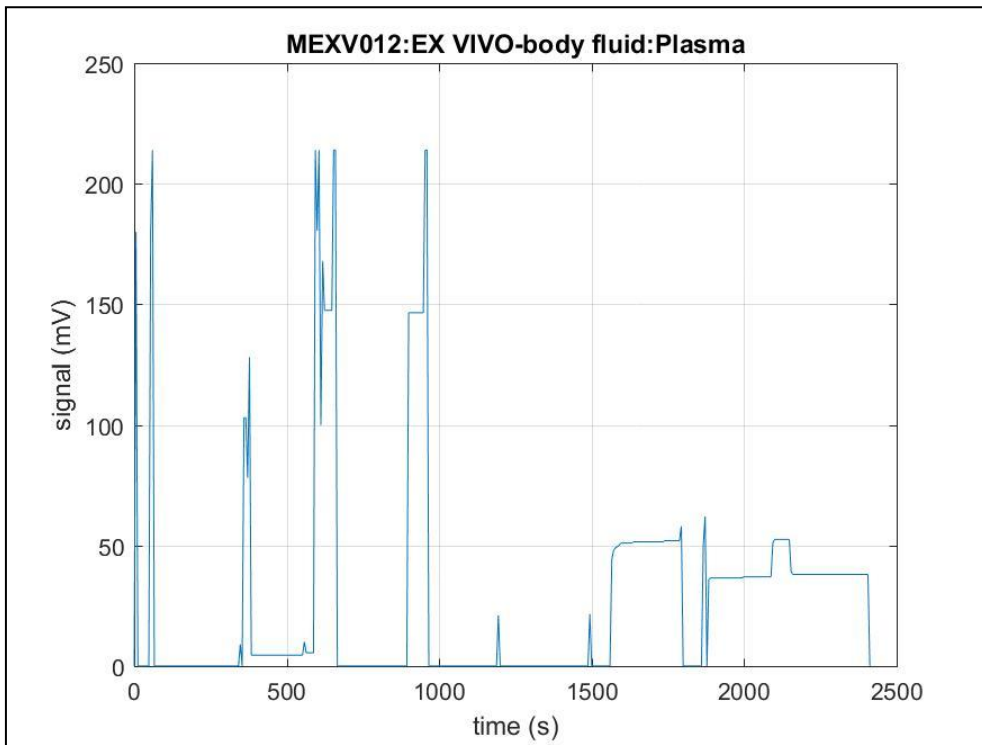
Σε συνέχεια των *in vitro* μετρήσεων, ακολούθησαν μετρήσεις σε βιολογικά υγρά, ήτοι *ex vivo*. Οι μετρήσεις αυτές είχαν μεγαλύτερο βαθμό δυσκολίας, μιας και τα υπό μέτρηση μόρια ήταν άγνωστα. Έτσι, αναμένετο οι μετρήσεις να περιλαμβάνουν ένα μείγμα από οξειδούμενα μόρια.

8.1. *Ex Vivo* Μέτρηση με Ηλεκτρόδιο Άνθρακα Πολλαπλών Ινών (Multi-Fiber Electrode) σε Δείγμα Πλάσματος Αίματος

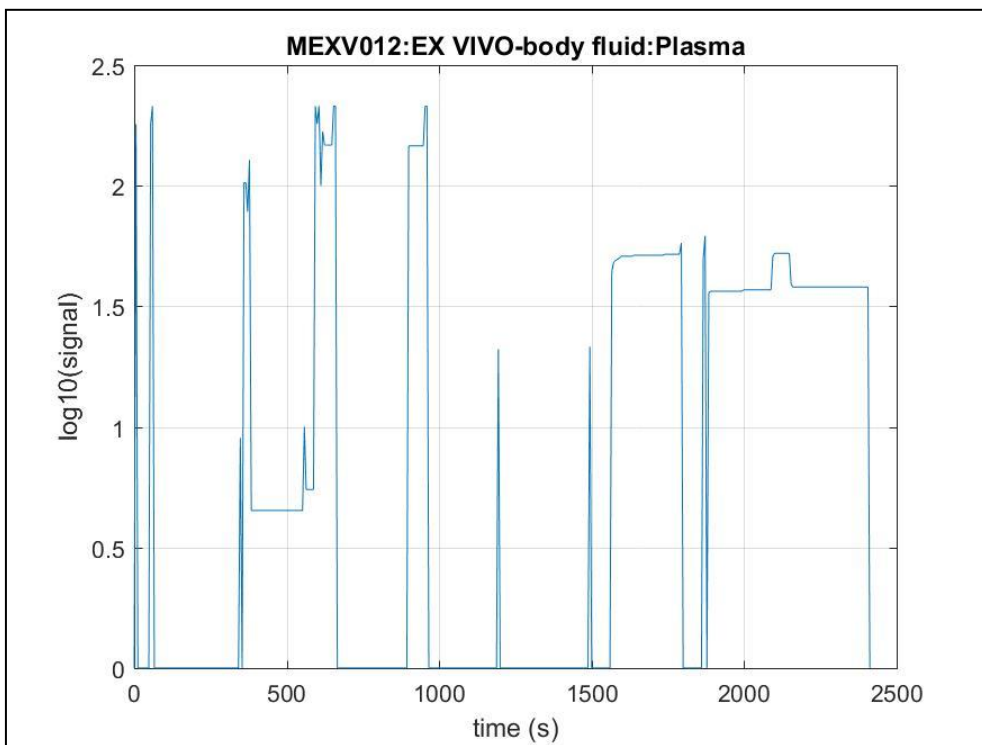
Στις παρακάτω εικόνες, παρουσιάζεται το βολταμμογράφημα από τη μέτρηση με ηλεκτρόδιο ινών άνθρακα (Εικόνα 66). Στην Εικόνα 67 παρουσιάζεται το λογαριθμημένο σήμα της μέτρησης. Επίσης, παρουσιάζονται η απόλυτη τιμή του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου (Εικόνα 68), η γωνία του μετασχηματισμού *Fourier* διακριτού χρόνου (Εικόνα 69), η απόλυτη τιμή του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 70) και η γωνία του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 71).

8.2. *Ex Vivo* Μέτρηση με Ηλεκτρόδιο Γραφίτη (Graphite Electrode) σε Δείγμα Πλήρους Αίματος

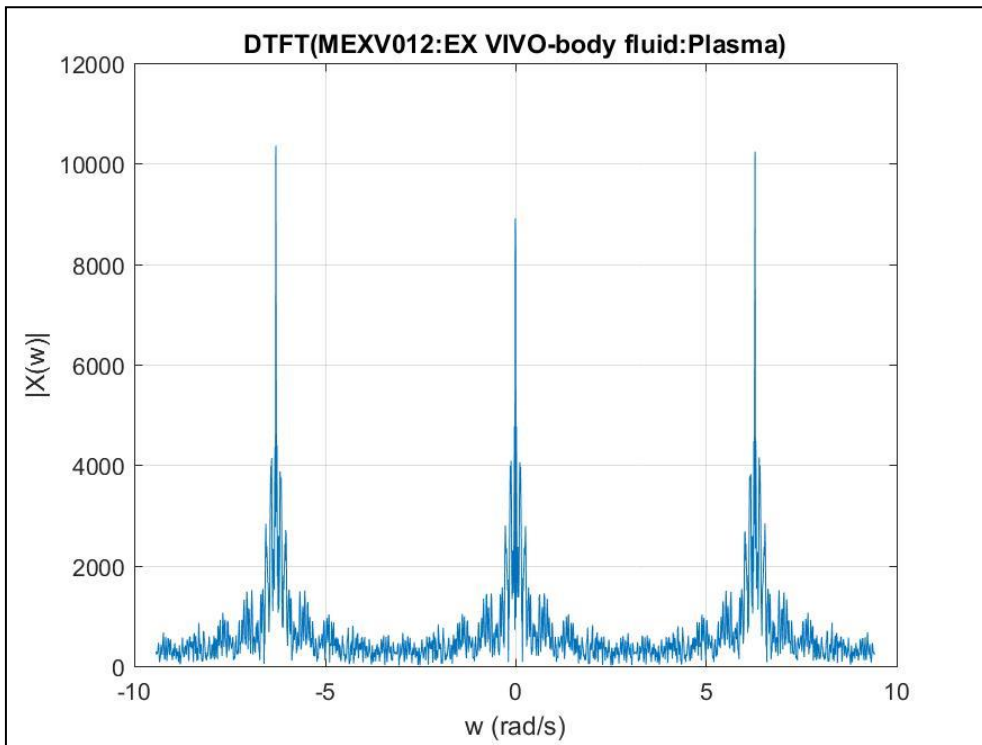
Στις παρακάτω εικόνες, παρουσιάζεται το βολταμμογράφημα από τη μέτρηση με ηλεκτρόδιο γραφίτη (Εικόνα 72). Στην Εικόνα 73 παρουσιάζεται το λογαριθμημένο σήμα της μέτρησης. Επίσης, παρουσιάζονται η απόλυτη τιμή του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου (Εικόνα 74), η γωνία του μετασχηματισμού *Fourier* διακριτού χρόνου (Εικόνα 75), η απόλυτη τιμή του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 76) και η γωνία του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 77).



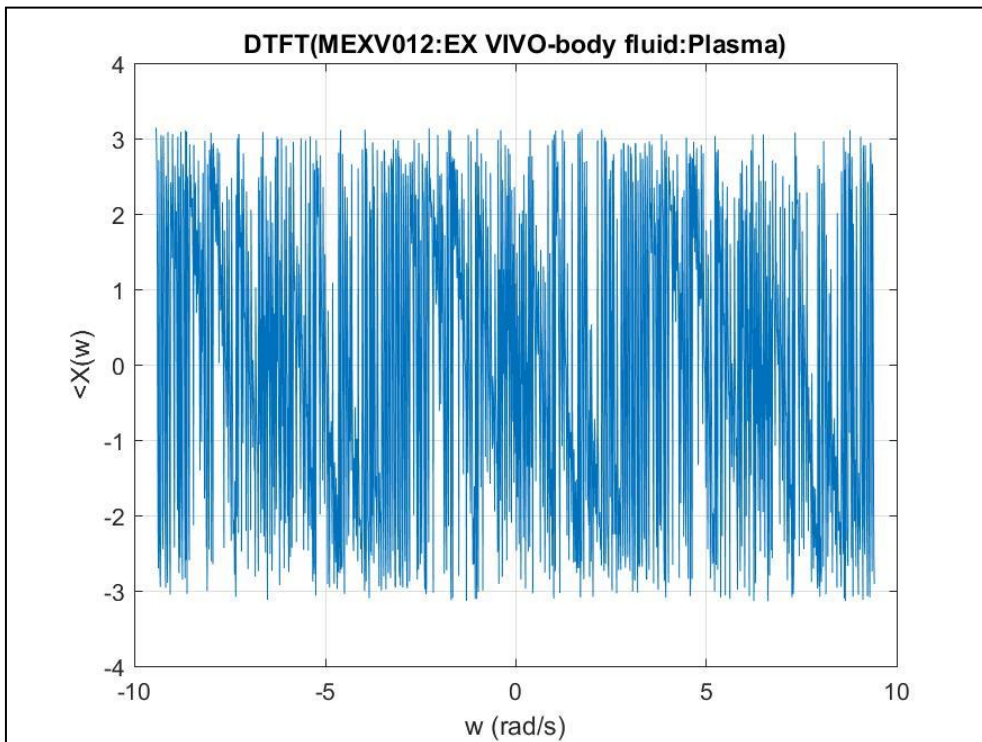
Εικόνα 66. Αναπαράσταση με Excel της *ex vivo* μέτρησης πλάσματος αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.



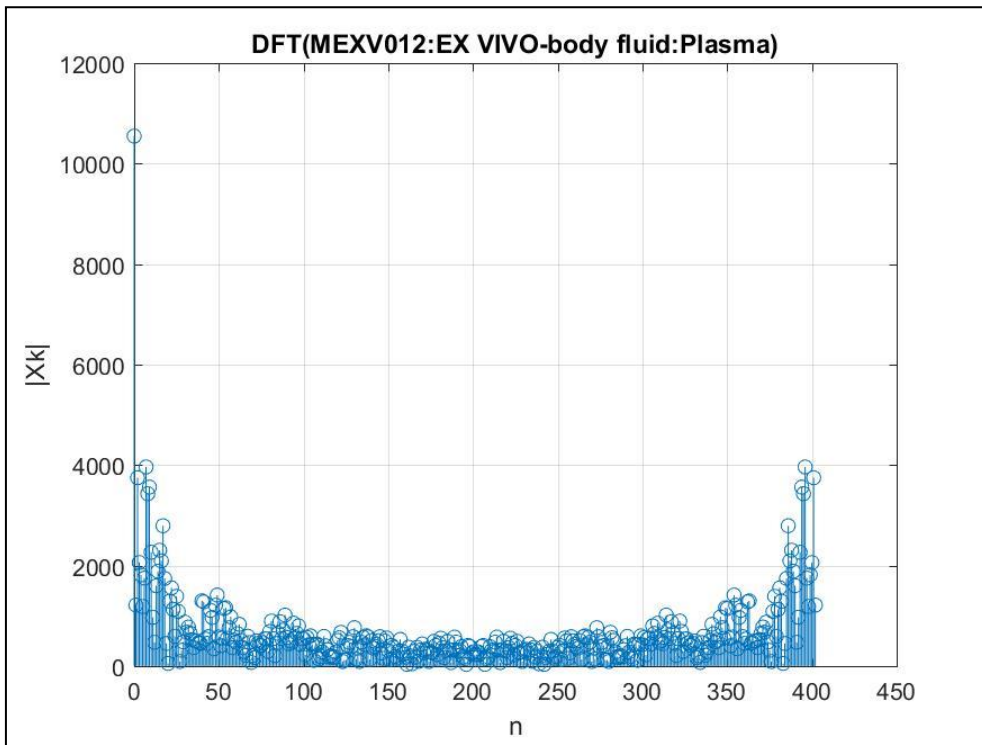
Εικόνα 67. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της *ex vivo* μέτρησης πλάσματος αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.



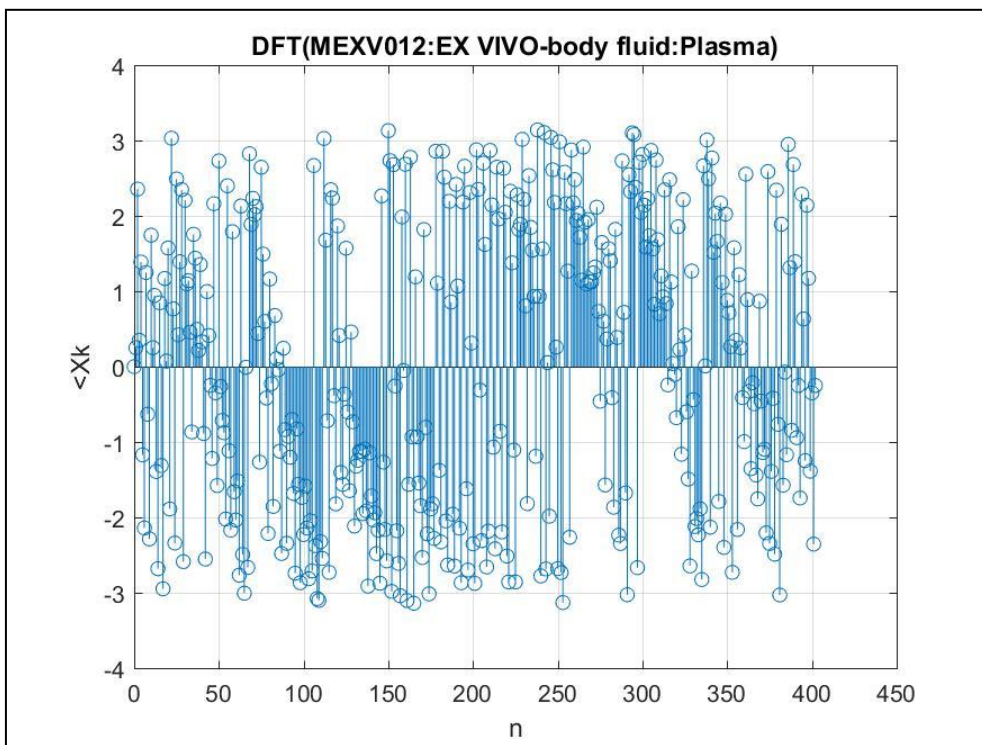
Εικόνα 68. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *ex vivo* μέτρησης πλάσματος αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.



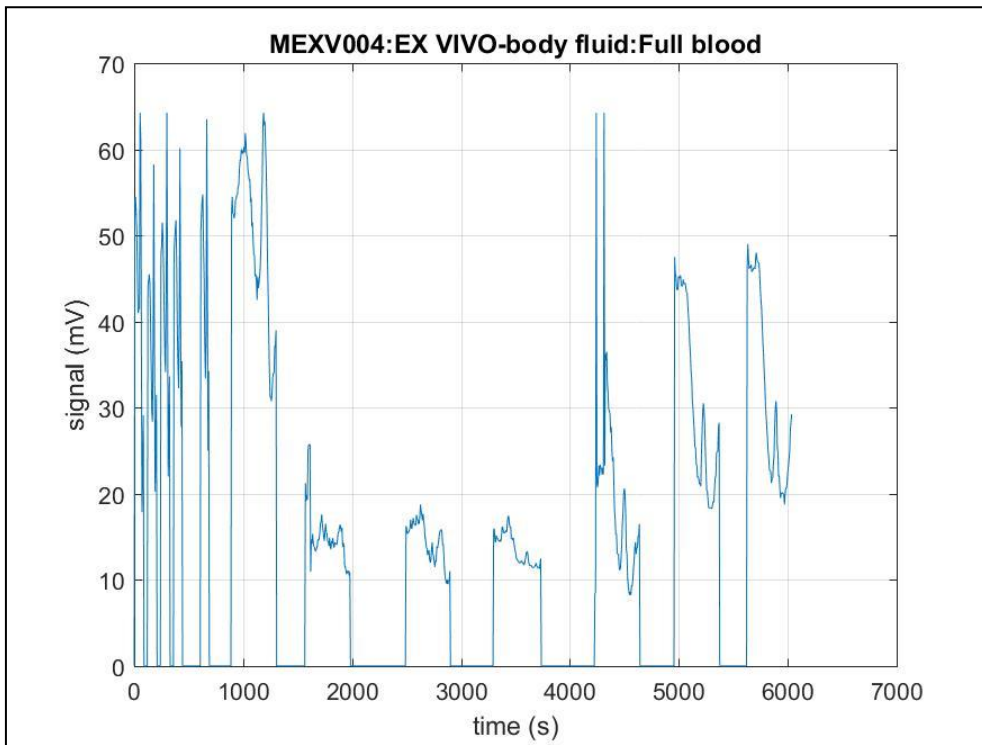
Εικόνα 69. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *ex vivo* μέτρησης πλάσματος αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ιών άνθρακα.



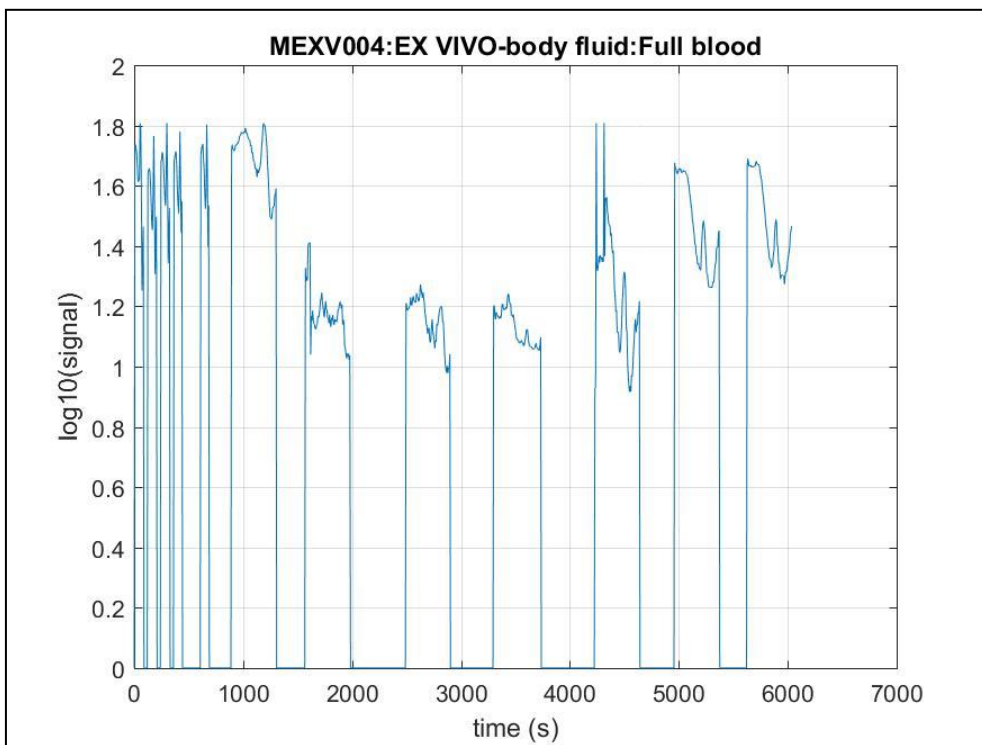
Εικόνα 70. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *ex vivo* μέτρησης πλάσματος αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ινών άνθρακα.



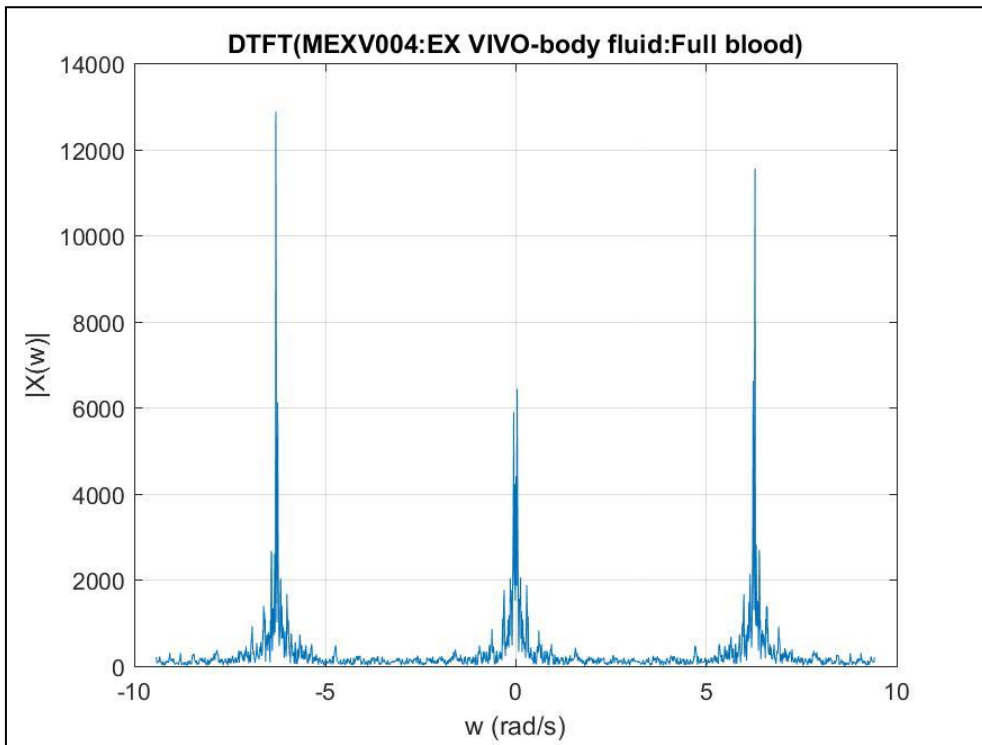
Εικόνα 71. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *ex vivo* μέτρησης πλάσματος αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο πολλαπλών ινών άνθρακα.



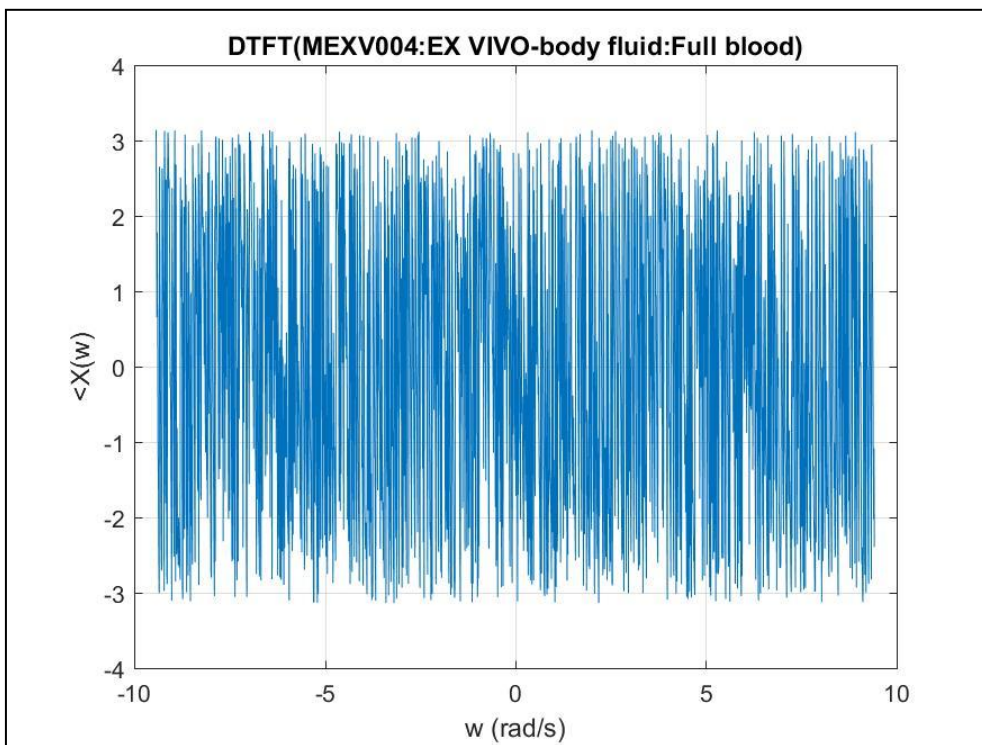
Εικόνα 72. Αναπαράσταση με Excel της *ex vivo* μέτρησης πλήρους αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



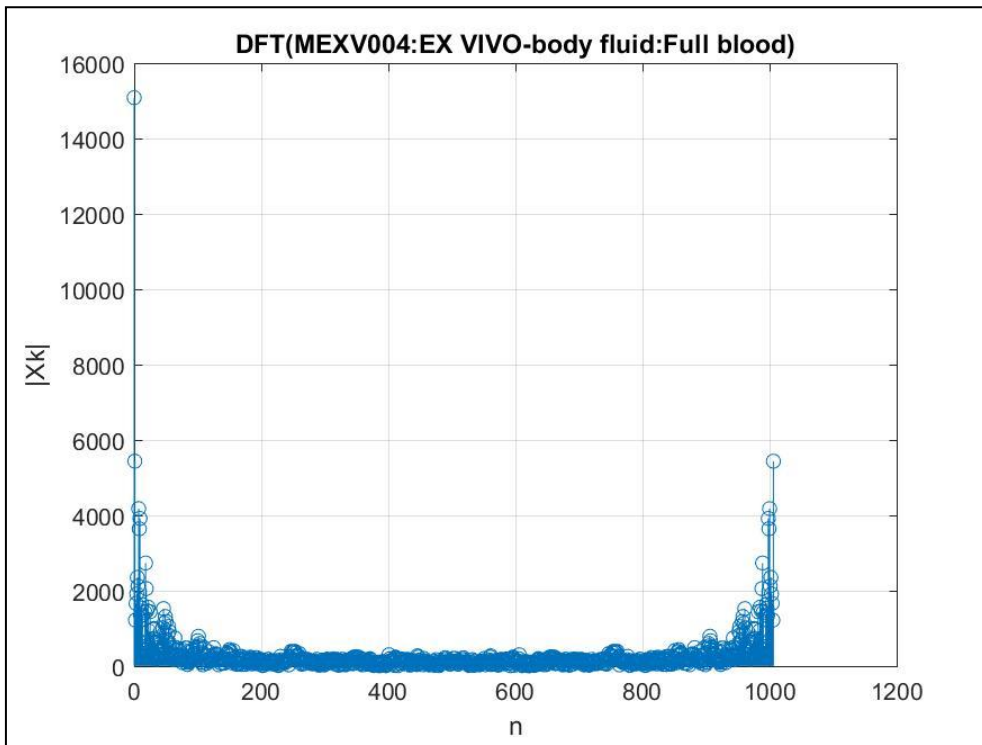
Εικόνα 73. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της *ex vivo* μέτρησης πλήρους αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



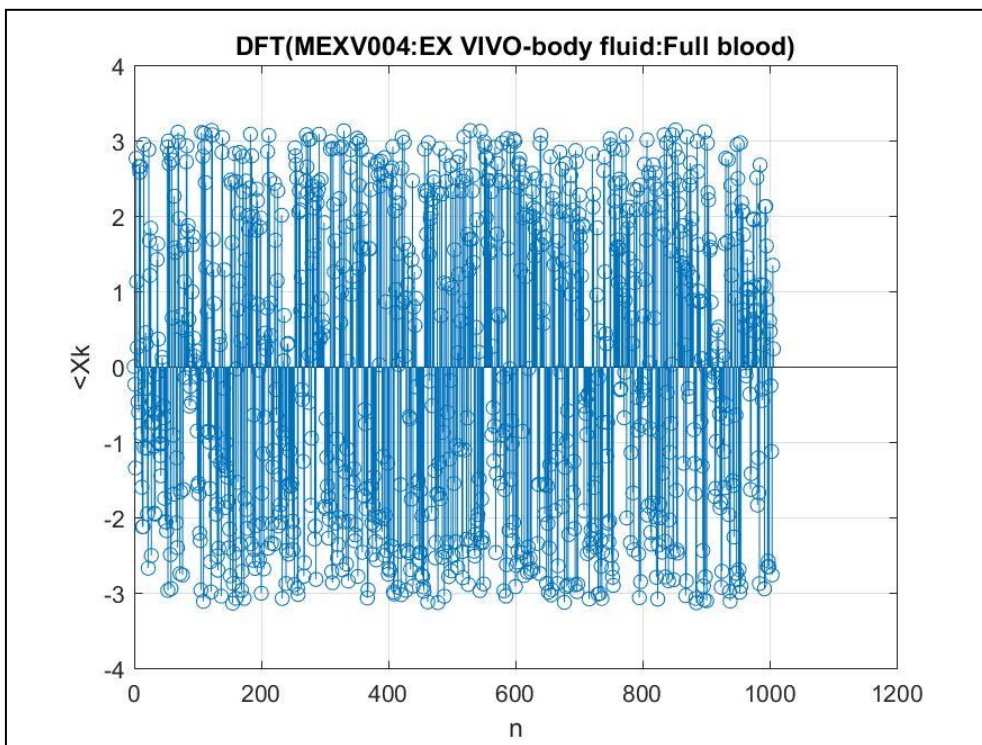
Εικόνα 74. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *ex vivo* μέτρησης πλήρους αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



Εικόνα 75. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *ex vivo* μέτρησης πλήρους αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



Εικόνα 76. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *ex vivo* μέτρησης πλήρους αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



Εικόνα 77. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *ex vivo* μέτρησης πλήρους αίματος σε ηλεκτροχημική κυψέλη με ηλεκτρόδιο γραφίτη.

9. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9-Η ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ *IN VIVO* ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

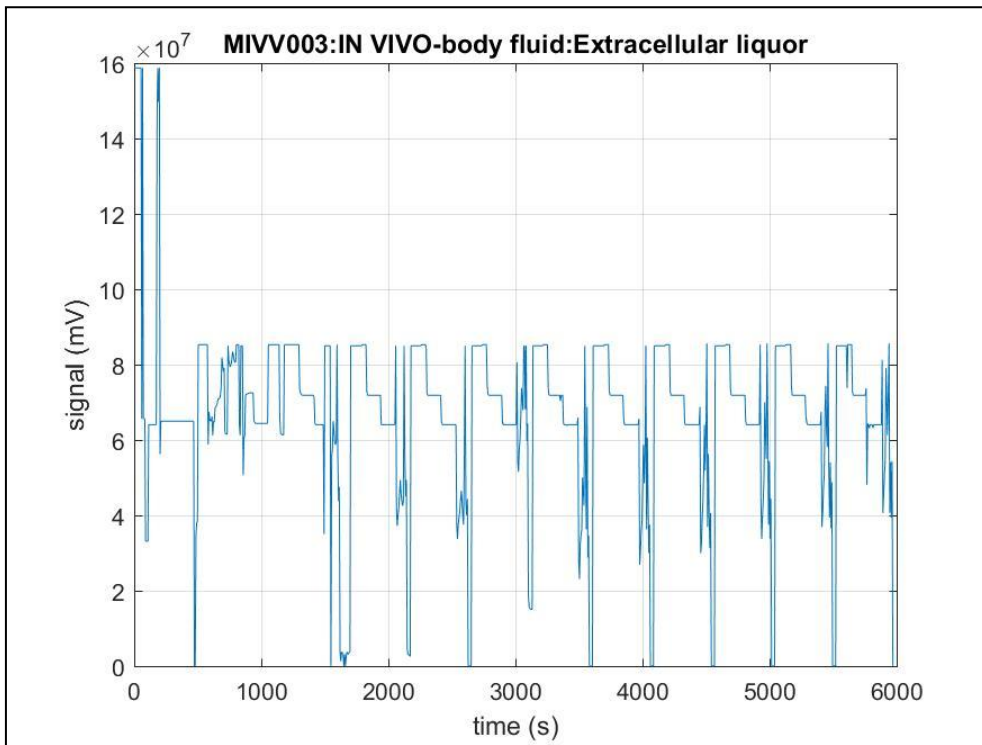
Σε συνέχεια των *in vitro* μετρήσεων, ακολούθησαν μετρήσεις σε επίμυες, ήτοι *in vivo*. Οι μετρήσεις αυτές είχαν μεγαλύτερο βαθμό δυσκολίας, μιας και τα υπό μέτρηση μόρια ήταν άγνωστα. Έτσι, αναμένετο οι μετρήσεις να περιλαμβάνουν ένα μείγμα από οξειδούμενα μόρια.

9.1. *In Vivo* Μέτρηση με Ηλεκτρόδιο Άνθρακα Μονής Ίνας (Single-Fiber Electrode) σε Εγκέφαλο Επίμυων

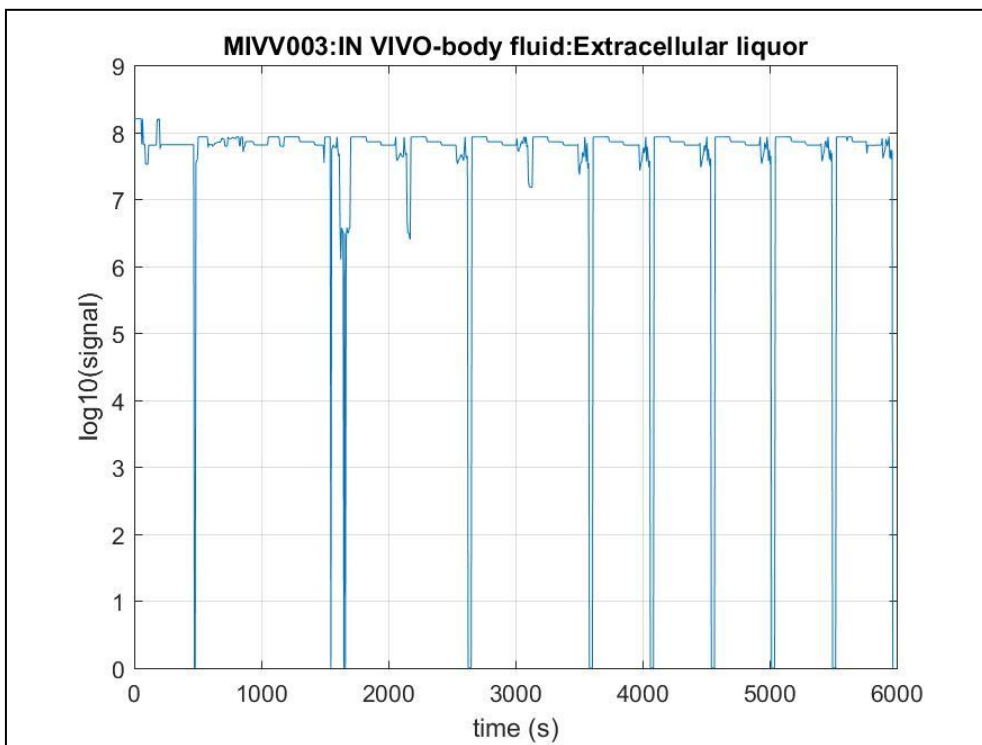
Στις παρακάτω εικόνες, παρουσιάζεται το βολταμμογράφημα από τη μέτρηση με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα στον εγκέφαλο επίμυων και ειδικότερα στην ανατομική θέση *substantia nigra* (μέλαινα ουσία) (Εικόνα 78). Στην Εικόνα 79 παρουσιάζεται το λογαριθμημένο σήμα της μέτρησης. Επίσης, παρουσιάζονται η απόλυτη τιμή του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου (Εικόνα 80), η γωνία του μετασχηματισμού *Fourier* διακριτού χρόνου (Εικόνα 81), η απόλυτη τιμή του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 82) και η γωνία του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 83).

9.2. *In Vivo* Μέτρηση με Ηλεκτρόδιο Γραφίτη (Graphite Electrode) σε Εγκέφαλο Επίμυων

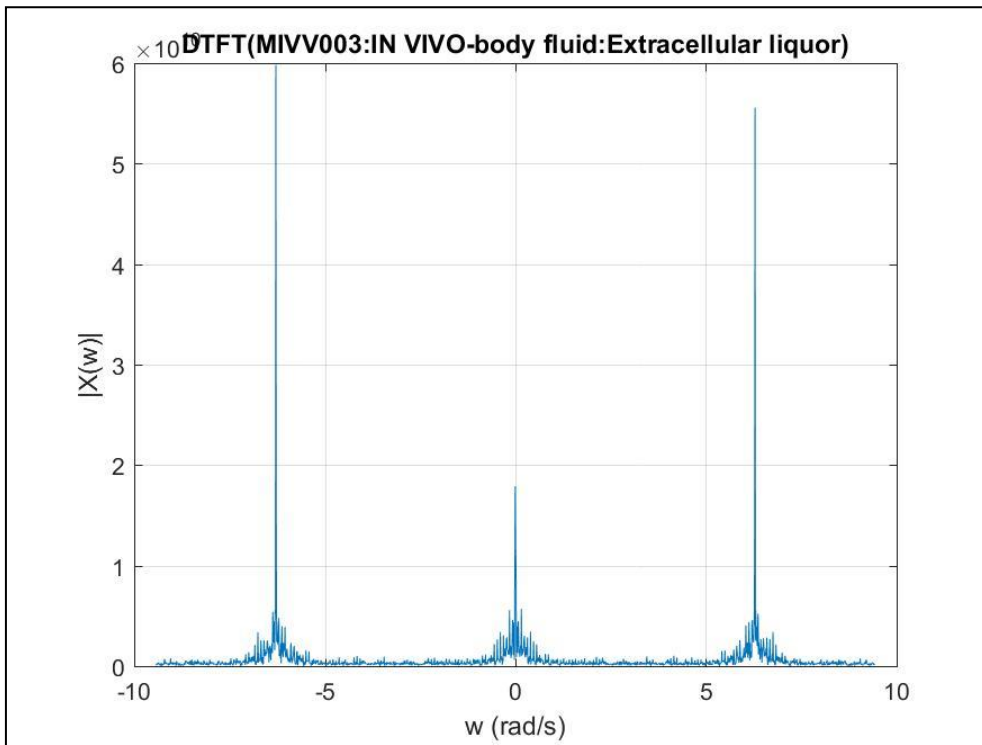
Στις παρακάτω εικόνες, παρουσιάζεται το βολταμμογράφημα από τη μέτρηση με ηλεκτρόδιο γραφίτη στον εγκέφαλο επίμυων και ειδικότερα στην ανατομική θέση *substantia nigra* (μέλαινα ουσία) (Εικόνα 84). Στην Εικόνα 85 παρουσιάζεται το λογαριθμημένο σήμα της μέτρησης. Επίσης, παρουσιάζονται η απόλυτη τιμή του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου (Εικόνα 86), η γωνία του μετασχηματισμού *Fourier* διακριτού χρόνου (Εικόνα 87), η απόλυτη τιμή του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 88) και η γωνία του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 89).



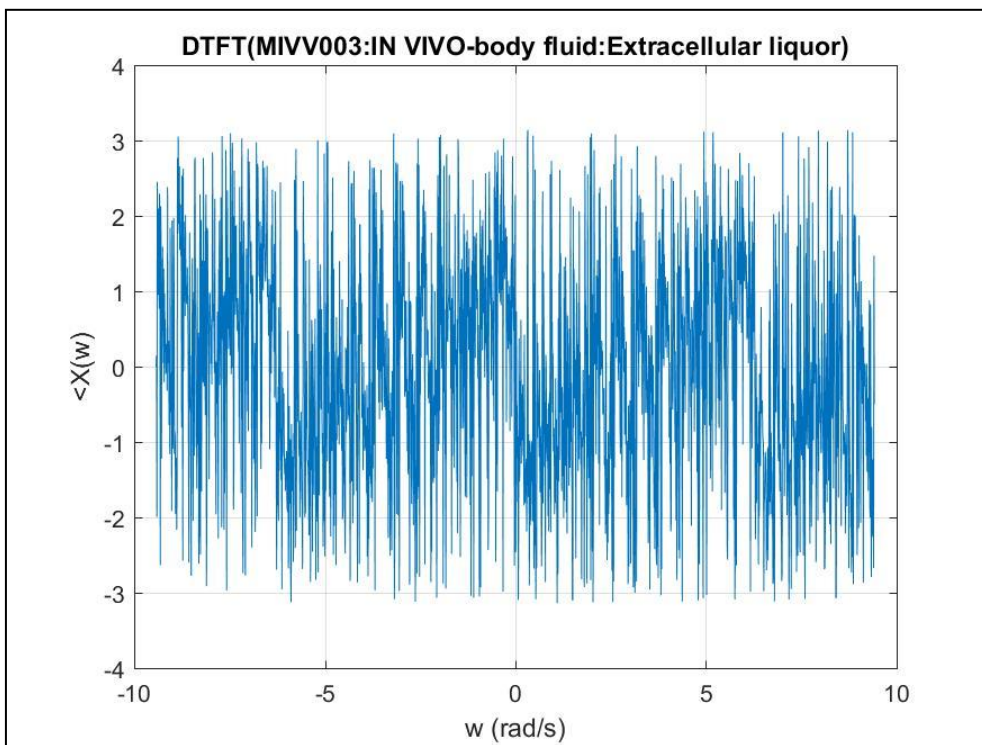
Εικόνα 78. Αναπαράσταση με Excel της *in vivo* μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.



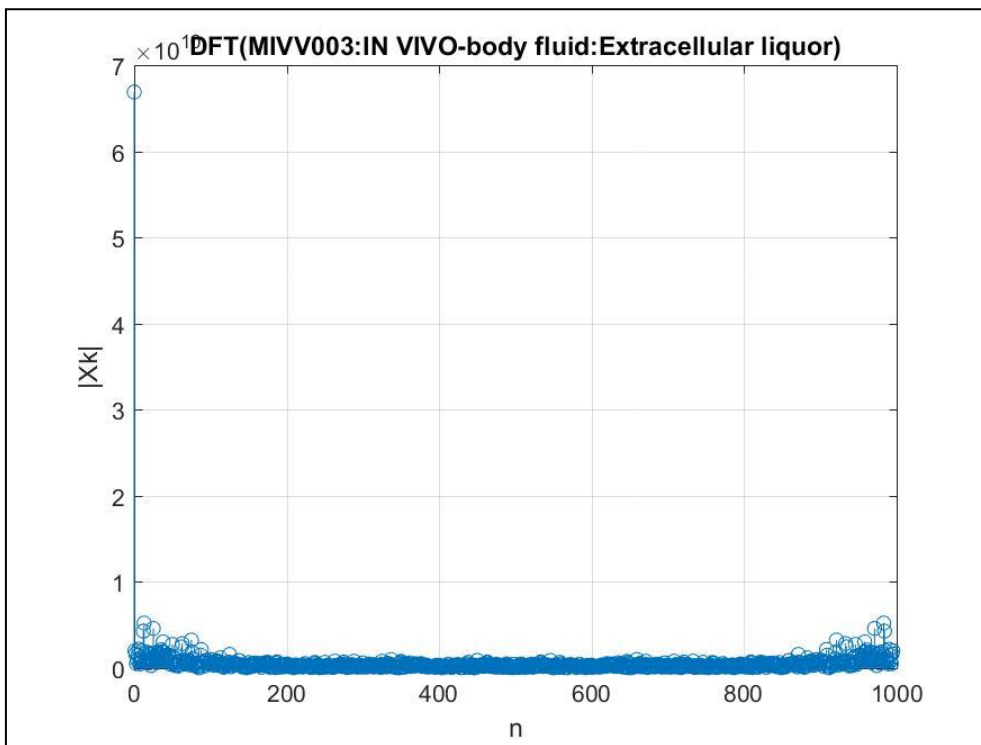
Εικόνα 79. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της *in vivo* μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.



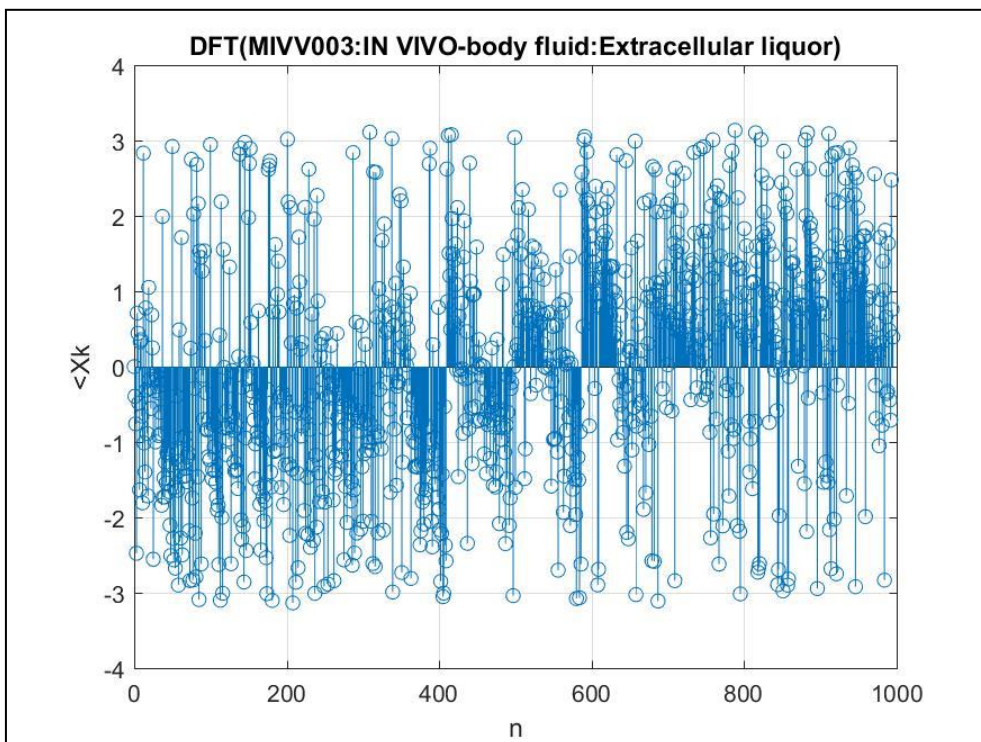
Εικόνα 80. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *in vivo* μέτρησης σε επίμνες με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.



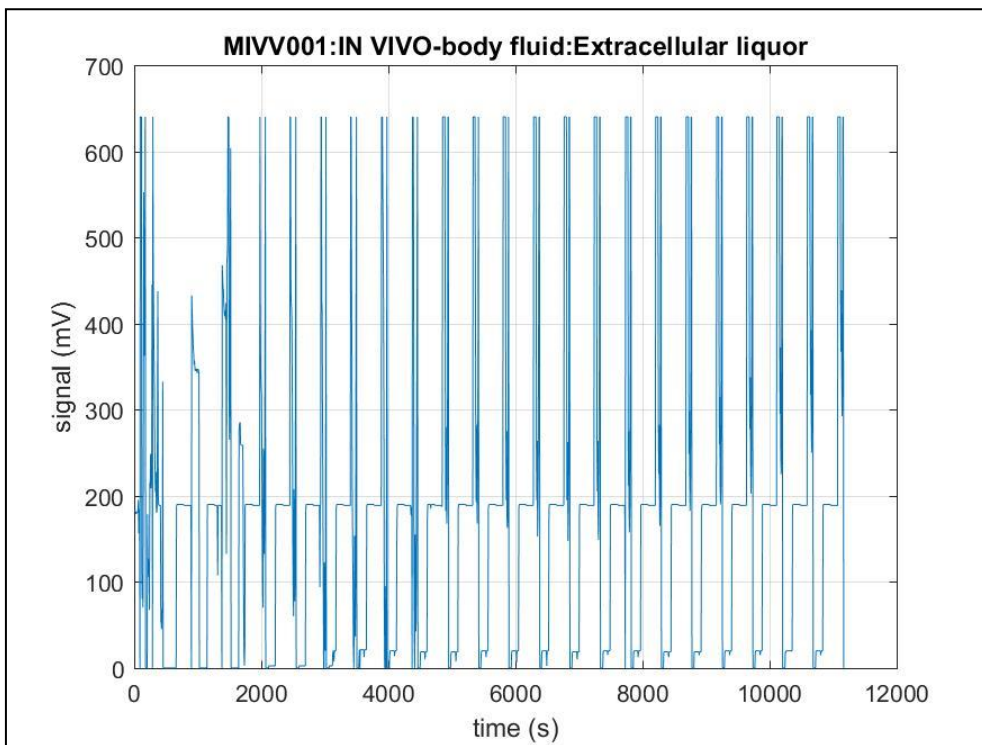
Εικόνα 81. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *in vivo* μέτρησης σε επίμνες με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.



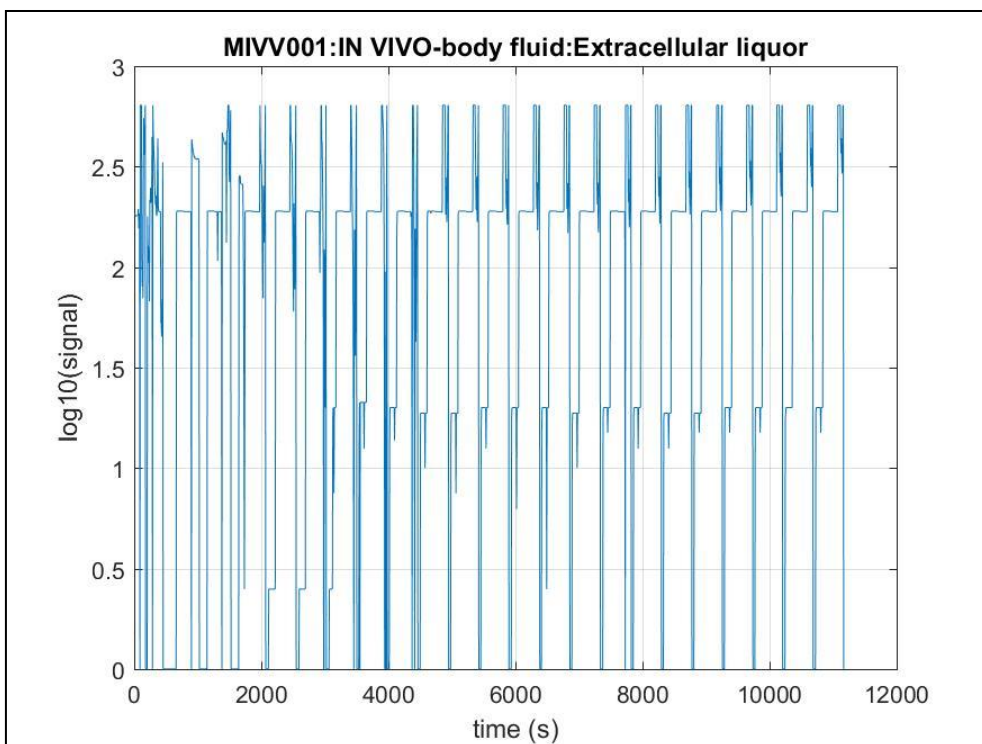
Εικόνα 82. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *in vivo* μέτρησης σε επίμνες με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.



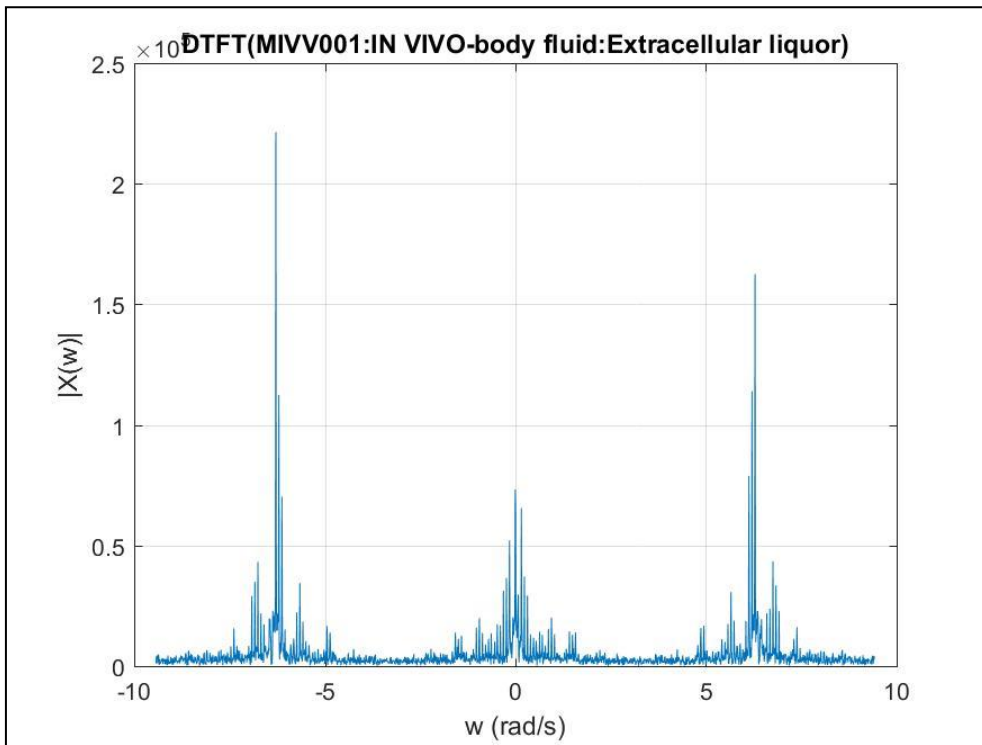
Εικόνα 83. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *in vivo* μέτρησης σε επίμνες με ηλεκτρόδιο μονής ίνας άνθρακα.



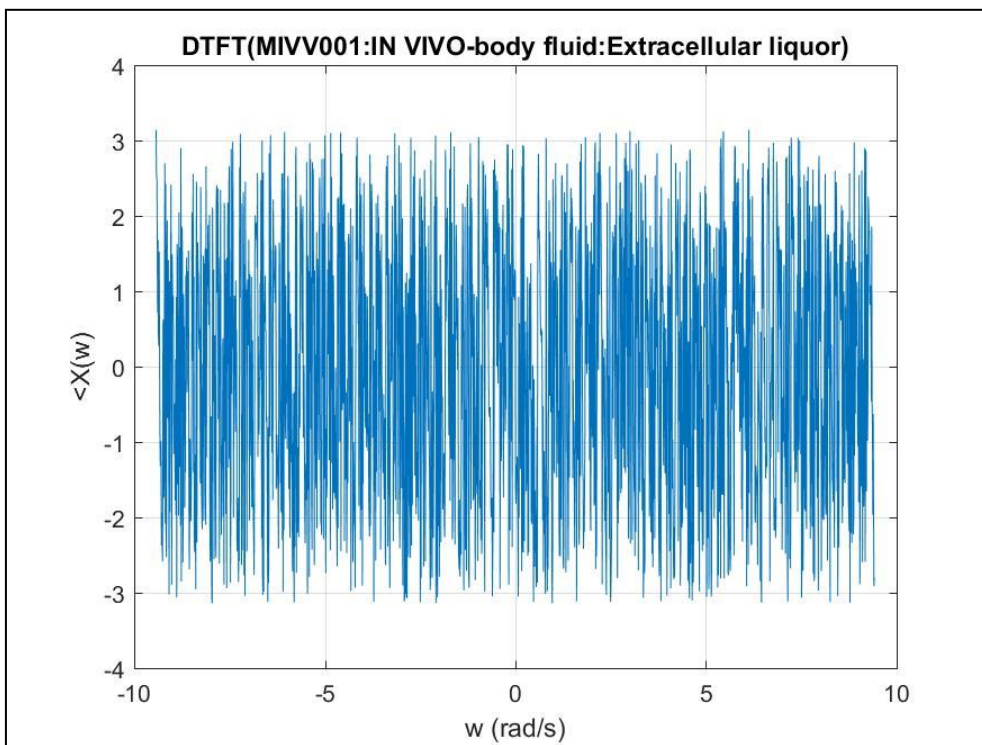
Εικόνα 84. Αναπαράσταση με Excel της *in vivo* μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



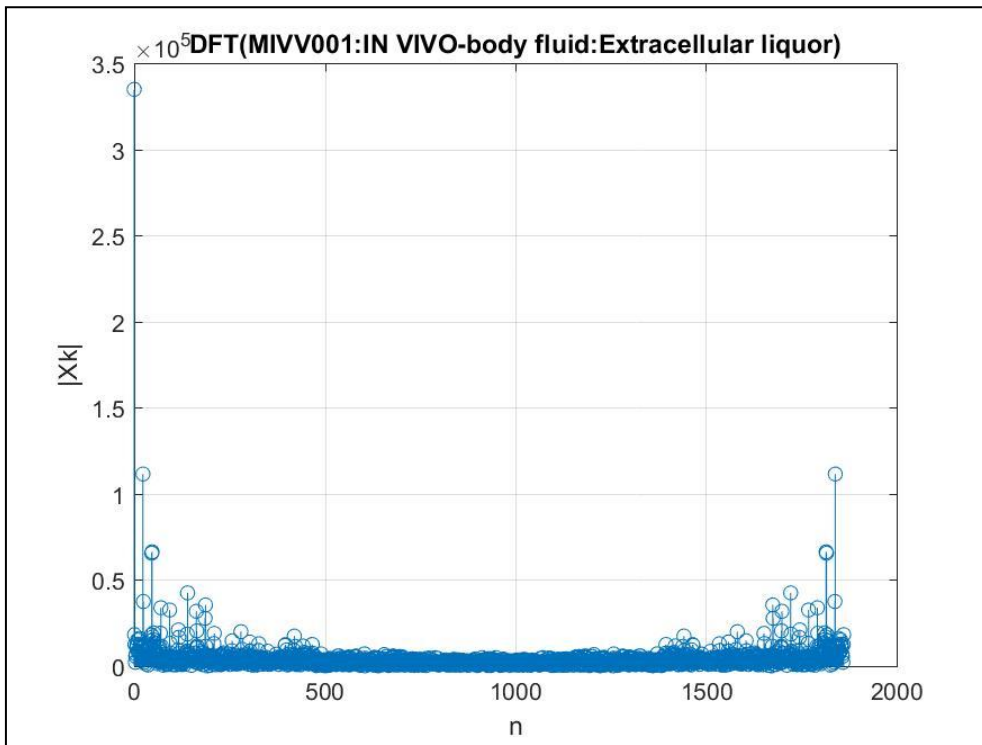
Εικόνα 85. Αναπαράσταση του λογαριθμημένου σήματος της *in vivo* μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



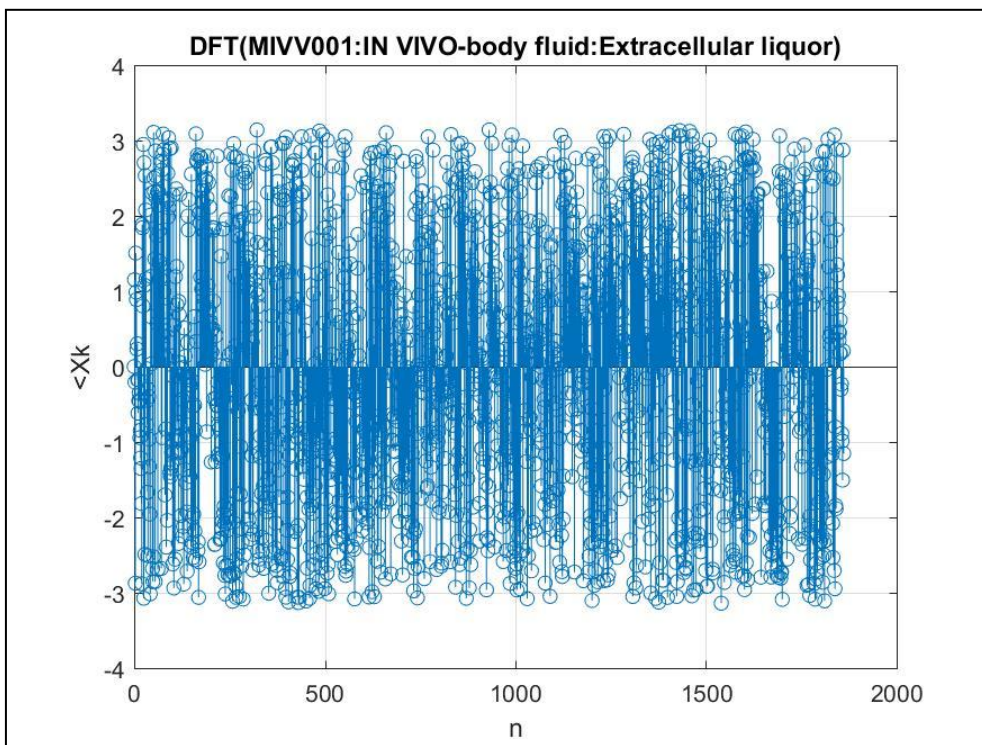
Εικόνα 86. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *in vivo* μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



Εικόνα 87. Αναπαράσταση της γωνίας του μετασχηματισμού Fourier διακριτού χρόνου, της *in vivo* μέτρησης σε επίμυες με ηλεκτρόδιο γραφίτη.



Εικόνα 88. Αναπαράσταση της απόλυτης τιμής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *in vivo* μέτρησης σε επίμνες με ηλεκτρόδιο γραφίτη.

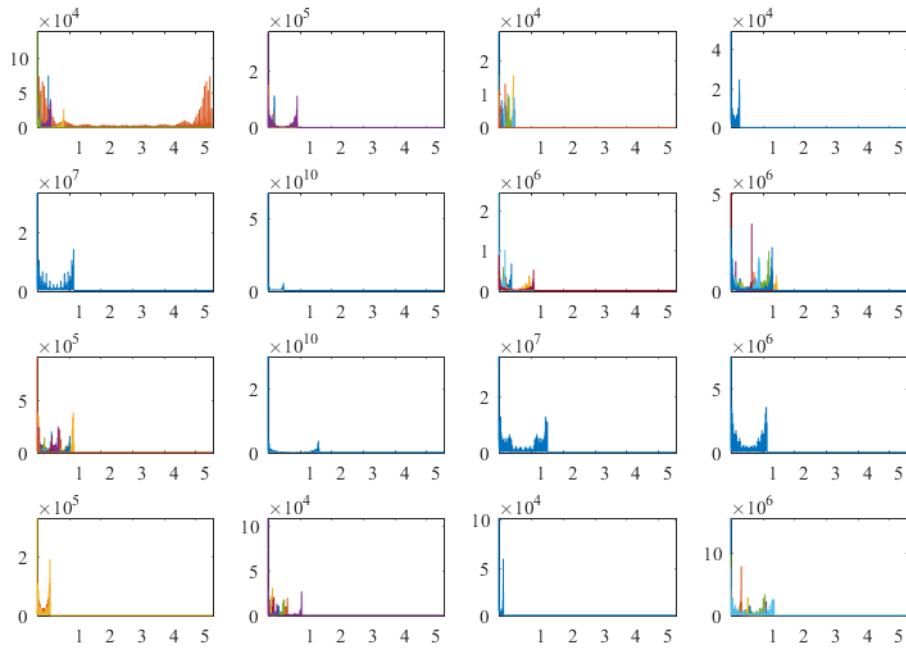


Εικόνα 89. Αναπαράσταση της γωνίας του διακριτού μετασχηματισμού Fourier, της *in vivo* μέτρησης σε επίμνες με ηλεκτρόδιο γραφίτη.

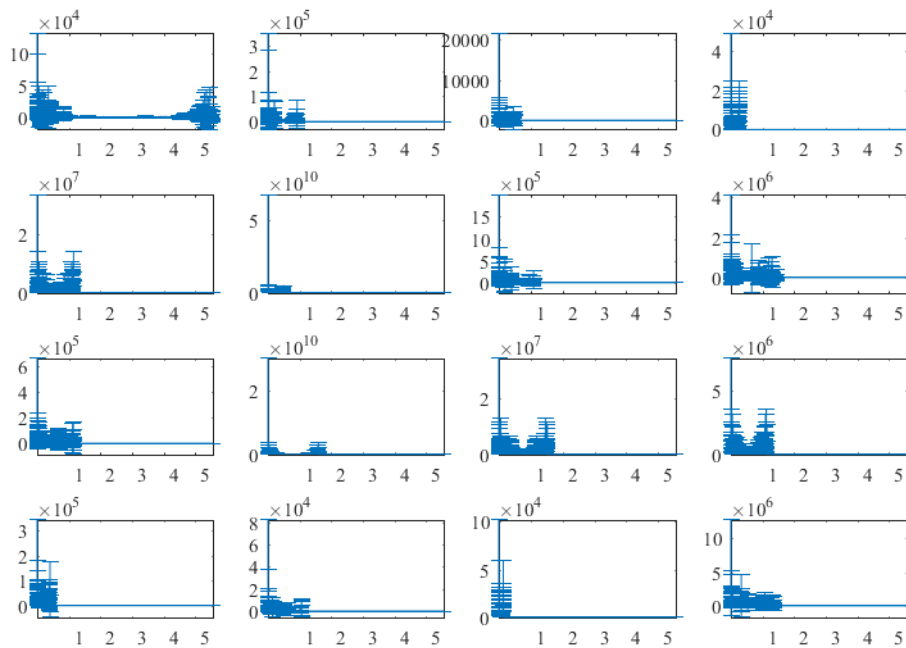
10 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 - ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑΤΑ FOURIER ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΣΗΜΑΤΩΝ

Οι μετασχηματισμένες τιμές των βολταμετρικών σημάτων ταξινομήθηκαν με τον αλγόριθμο k-means. Ο DFT δεν ταξινόμησε τα μετασχηματισμένα σήματα με βάση το είδος της μέτρησης (**Εικόνα 90**). Αντίθετα, ο DTFT μπόρεσε να ταξινομήσει ομοειδείς μετρήσεις (**Εικόνα 91**). Οι συστάδες 4 και 10, αφορούν σε μετρήσεις του DOPAC. Αντίστοιχα, στη συστάδα 13 ταξινομήθηκαν μαζί οι μετρήσεις σε δείγματα αίματος και η *in vitro* μέτρηση σεροτονίνης (**Εικόνα 91**). Το αποτέλεσμα αυτό έδειξε ότι στις μετρήσεις αίματος το κύριο μόριο που αξιολογήθηκε ήταν η σεροτονίνη. Στη συστάδα 19, ταξινομήθηκαν μαζί οι μετρήσεις του αίματος και οι μετρήσεις σεροτονίνης και DOPAC, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι *ex vivo* μετρήσεις περιελάμβαναν πράγματι την εκτίμηση των μορίων, που είχαν αξιολογηθεί και *in vitro* στα πειράματα ελέγχου (**Εικόνα 91**). Αντίστοιχα, στις συστάδες 22, 23, 25 ταξινομήθηκαν μαζί οι *in vitro* μετρήσεις σεροτονίνης (**Εικόνα 91**).

DFT ABS: Clusters

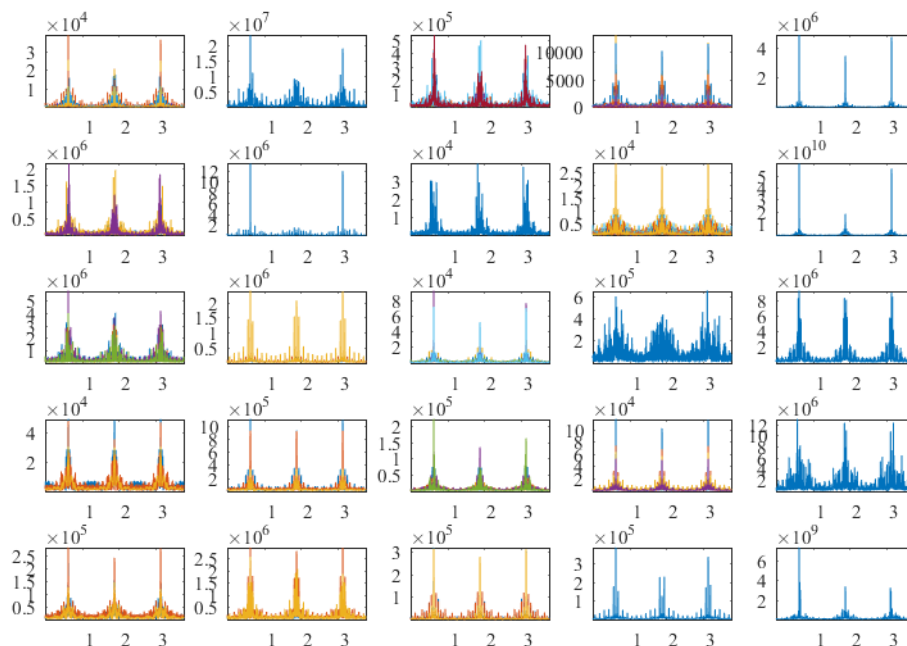


DFT ABS: Centroids

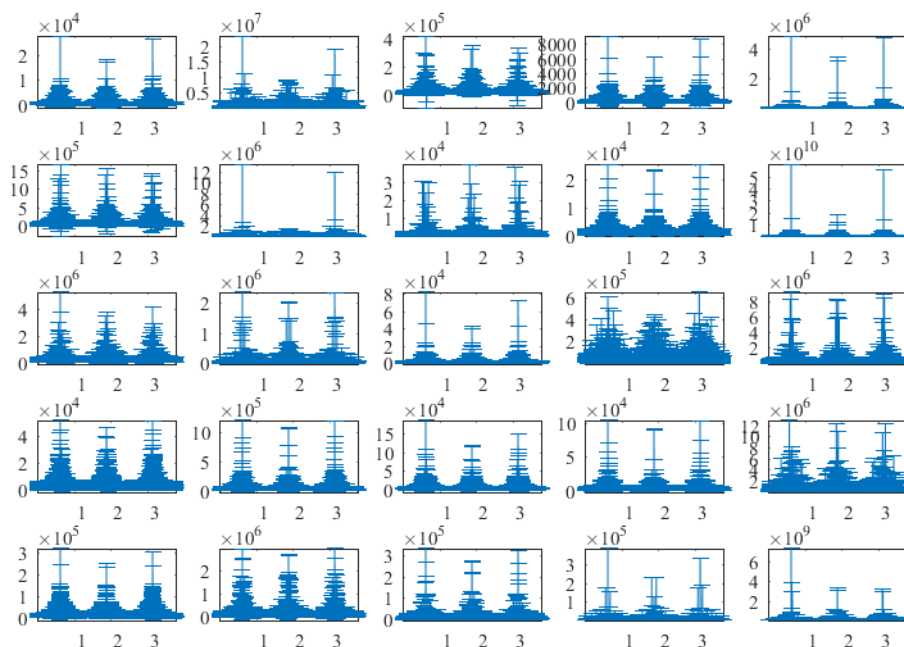


Εικόνα 90. Ταξινόμηση των DFT. Η αρίθμηση των συστάδων γίνεται από πάνω αριστερά και προς τα δεξιά.

DTFT ABS: Clusters



DTFT ABS: Centroids



Εικόνα 91. Ταξινόμηση των DTFT. Η αρίθμηση των συστάδεων γίνεται από πάνω αριστερά και προς τα δεξιά.

ΜΕΡΟΣ IV
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

11 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11-ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η βολταμμετρία έχει χρησιμοποιηθεί, για την ανίχνευση μονοαμινών τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μετρήσεις. Στην παρούσα εργασία, επεξεργαστήκαμε μη δημοσιευμένα αποτελέσματα από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Νευροχημείας, στο Philipps-Universitaet, Marburg (Lahn), Γερμανίας. Στα συγκεκριμένα πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρόδια από ίνες άνθρακα και γραφίτη με διάμετρο 3-100 μ m. Τα ηλεκτρόδια κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο, όπως αναφέρθηκε στις προηγούμενες ενότητες.

Οι μετρήσεις που αναλύθηκαν αφορούσαν στην εκτίμηση των επιπέδων των πιο γνωστών μονοαμινών. Η αρχική εγγραφή ήταν αναλογική και για να μπορέσουμε να επεξεργαστούμε το πλήρες σήμα και όχι μόνο το πλάτος της οξειδωσης, αναπτύξαμε μια μέθοδο ψηφιοποίησης του σήματος. Η ψηφιοποίηση σημάτων αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διερεύνηση των ιδιοτήτων του σήματος. Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία υλοποιήσαμε ένα μετασχηματισμό Fourier διακριτού χρόνου (DTFT) καθώς και ένα διακριτό μετασχηματισμό Fourier (DFT).

Η βολταμμετρία, η οποία αποτέλεσε τη βελτίωση της πολαρογραφικής μεθόδου, έχει αποδειχθεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διερεύνηση των επιπέδων των μονοαμινών. Οι μονοαμίνες είναι απαραίτητα μόρια στη φυσιολογία του ΚΝΣ. Η ανίχνευση και η διερεύνησή τους είναι κρίσιμης σημασίας και, ταυτόχρονα, η ανίχνευσή τους είναι εξαιρετικά δύσκολη. Το κύριο πρόβλημα με την ανίχνευση των μονοαμινών είναι ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής τους είναι πολύ μικρός, ήτοι δεν είναι πολύ εύκολο να ταυτοποιηθούν *ex vivo*. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται μέθοδοι οι οποίες θα μπορούν να μετρήσουν τις μονοαμίνες *in vivo*. Προς αυτή την κατεύθυνση, η βολταμμετρία αποδεικνύεται μια εξαιρετικά χρήσιμη μέθοδος, αφού μπορεί να μετρήσει τα επίπεδα των μονοαμινών *in vivo*.

Στο βαθμό που γνωρίζουμε δεν υπάρχουν πολλές εργασίες, που να έχουν αναλύσει βολταμμετρικά σήματα με τη χρήση μετασχηματισμών Fourier. Σε μια πρόσφατη εργασία, χρησιμοποιήθηκε ένα υπόδειγμα μετασχηματισμών Fourier και Bayesian δέντρων προς ανίχνευση της αποδοτικότητας των ηλεκτροδίων στη βολταμμετρία (67). Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι προαναφερόμενες μεθοδολογίες, ώστε να προβλεφθεί η ταυτοποίηση οξειδοαναγωγικών μορίων. Στην ίδια εργασία, φάνηκε ότι η χρήση τέτοιων προσεγγίσεων είναι μια ικανή λύση να προσομοιώσει και να προβλέψει καθώς και να αναλύσει τις τιμές των οξειδοαναγωγικών μορίων.

Αντίστοιχα, σε άλλη μελέτη μια παρόμοια μεθοδολογία εφαρμόστηκε στην ταυτοποίηση της σεροτονίνης (68).

Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι, σε πιο σύγχρονες μεθόδους της βολταμμετρίας, η εφαρμογή του σήματος (ρεύματος) εισόδου έχει ήδη μετασχηματισθεί με διακριτό μετασχηματισμό Fourier και αυτό χρησιμοποιείται σαν μια μέθοδος καλύτερης ανίχνευσης των οξειδοαναγωγικών μορίων (69). Η μέθοδος αυτή έχει βρει εφαρμογές σε μεγάλο εύρος μορίων, που ξεκινούν από την ανίχνευση ιόντων μέχρι τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε πρωτεΐνες (70).

Σε άλλη πρόσφατη μελέτη, έγινε αναφορά για τη χρήση του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (DFT) στην ανάλυση των ηλεκτροχημικών σημάτων με σκοπό την αύξηση της ειδικότητας και ευαισθησίας του σήματος (71). Στη μελέτη αυτή, μελετήθηκε η ηλεκτροχημική ανίχνευση ορισμένων ηλεκτρο-ενεργών μορίων με τη χρήση κεραμικών ινών με νανοσωλήνες άνθρακα. Με βάση τη μέθοδο DFT, το σήμα διαχωρίζεται σε δύο φάσεις, ήτοι αυτή της πραγματικής φάσης και της μιγαδικής φάσης. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι σε διαφορετικές μεθοδολογίες, όπως η κυκλική βολταμμετρία (CV), η εφαρμογή του DFT στα ηλεκτροχημικά σήματα βελτιώνει σημαντικά το όριο ανίχνευσης της ηλεκτροχημικής τεχνικής (72).

Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι οι μαθηματικές προσεγγίσεις στην ανάλυση των βολταμμετρικών σημάτων είναι μια σημαντική προσέγγιση, η οποία μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση τόσο της μεθόδου όσο και στη διακριτική ικανότητα της βολταμμετρικής μεθόδου. Ένα από τα βασικά προβλήματα της βολταμμετρίας είναι η διάκριση που μπορεί να κάνει ανάμεσα σε μόρια με πλησίοντα σημεία οξειδοαναγωγής. Δηλαδή, όταν δύο μόρια οξειδώνονται σε κοντινά επίπεδα τάσεως (π.χ. η σεροτονίνη οξειδώνεται στα 650mV και το DOPAC οξειδώνεται στα 600mV), δεν είναι εύκολο να διαχωρισθούν με τη βολταμμετρία. Προς την κατεύθυνση αυτή, έρχεται να βοηθήσει η μαθηματική μεθοδολογία που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα εργασία όσο και σε άλλες εργασίες.

Η εφαρμογή των ηλεκτροχημικών μεθόδων και η εφαρμογή τους στα βιολογικά συστήματα έχουν σχετικά σύντομο ιστορικό. Αν και φαίνεται ότι οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι δεν έχουν ευαισθησία και ειδικότητα, τουλάχιστον όχι στο βαθμό που έχουν άλλες μεθοδολογίες, εξακολουθούν να αποτελούν τη μόνη λύση για την ταυτοποίηση βιολογικών μορίων *in vivo*

και σε πραγματικό χρόνο. Αυτό είναι ακόμα πιο σημαντικό στην περίπτωση των μετρήσεων στο ΚΝΣ. Ειδικά για την περίπτωση του ΚΝΣ οι περισσότερες μεθοδολογίες, μπορούν να ταυτοποιήσουν τα σηματοδοτικά μόρια του ΚΝΣ μόνο με δειγματοληψία σε μια χρονική στιγμή. Οι μεθοδολογίες αυτές έχουν μεγάλη διακριτική ικανότητα αλλά μόνο για μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή του φαινομένου. Αντίθετα, η βολταμμετρία μπορεί να ταυτοποιήσει μόρια σε πραγματικό χρόνο και απευθείας στον ανατομικό τόπο ενδιαφέροντος αλλά και για όλη την εξέλιξη του φαινομένου. Παραδείγματα τέτοιων μετρήσεων αποτελούν οι μετρήσεις σεροτονίνης σε μοντέλα επίμυων υπό συνθήκες στρες, ή χορήγησης φαρμάκων (10, 19, 28, 39, 53, 54, 56).

Τα πρώτα πειράματα βολταμμετρίας ελάμβαναν χώρα με τη χρήση αναλογικού σήματος, αλλά αυτό άλλαξε καθώς οι συσκευές μέτρησης έγιναν ψηφιακές και ως εκ τούτου, η περαιτέρω επεξεργασία του σήματος έγινε με πιο προηγμένα υπολογιστικά εργαλεία. Προς την κατεύθυνση αυτή μεγάλη πρόοδος έγινε και στην εξέλιξη και ανάπτυξη των ηλεκτροδίων.

Οι ηλεκτροχημικές και ειδικότερα οι βολταμμετρικές ιδιότητες των βιολογικών υγρών αποτελούν ένα πολύ σημαντικό αντικείμενο έρευνας. Θεωρητικά, η ικανότητα της μελέτης των ηλεκτροχημικών ιδιοτήτων των βιολογικών υγρών, θα μας έδινε νέα μη παρεμβατικά εργαλεία για τη διάγνωση, την πρόγνωση ή ακόμα και τη θεραπεία των νοσημάτων και ειδικότερα αυτών του ΚΝΣ. Ωστόσο, ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην ανίχνευση των βιομορίων, είναι ότι πολλά από αυτά διαθέτουν ηλεκτροχημικές ιδιότητες οι οποίες είναι όμοιες, όπως το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, η αντίσταση, η αγωγιμότητα κλπ. Για να γίνουν ειδικοί διαχωρισμοί μεταξύ των μορίων, απαιτείται η εφαρμογή σήματος χαμηλότερου μήκους κύματος (ήτοι υψηλότερη ενέργεια) και πρέπει να χρησιμοποιούνται ηλεκτρομαγνητικά πεδία μεγάλης ενέργειας. Αυτό, όμως, έχει το μειονέκτημα ότι τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα υψηλής ενέργειας έχουν υψηλή μεταλλαξιογενή δράση, επικίνδυνη για τα ζώντα συστήματα. Από την άλλη πλευρά, η χρήση ηλεκτροχημικών μεθόδων, όπως η βολταμμετρία, για τη μελέτη της φυσιολογίας του ΚΝΣ μας επέτρεψε μέχρι σήμερα να κατανοήσουμε περαιτέρω τις βασικές πτυχές της εγκεφαλικής λειτουργίας, πράγμα αδύνατο με τη χρήση συμβατικών μεθόδων.

Οι γνώσεις μας σχετικά με τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες των βιορευστών, και κατ' επέκτασιν των ζωντανών συστημάτων, είναι ακόμη πολύ περιορισμένες και, ως εκ τούτου, υπάρχει μεγάλο κενό γνώσης. Κατά συνέπεια, υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω έρευνες για την

κατανόηση των ηλεκτροχημικών ιδιοτήτων των βιορευστών και, συνεπώς, για τη χρησιμοποίηση αυτής της γνώσης προς όφελος των βιολογικών συστημάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kurian MA, Gissen P, Smith M, Heales S, Jr., Clayton PT. The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes. *The Lancet Neurology*. 2011;10(8):721-33.
2. Mele T, Carman-Krzan M, Juric DM. Regulatory role of monoamine neurotransmitters in astrocytic NT-3 synthesis. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2010;28(1):13-9.
3. Lodish H, Berk A, Darnell JE, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, et al. *Molecular cell biology*: Macmillan; 2008.
4. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. Cold Spring: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
5. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Biochemistry Do, Jessell MBT, Siegelbaum S, et al. *Principles of neural science*: McGraw-hill New York; 2000.
6. Διδώ Γ. *Εισαγωγή στη νανοβιοφυσική και οπτική απεικόνιση*. Αθήνα: Εκδόσεις Συμμετρία; 2011.
7. Ansermet F, Magistretti P. *Biology of freedom: Neural plasticity, experience, and the unconscious*: karnac books; 2007.
8. Vogt M. The concentration of sympathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after the administration of drugs. *The Journal of physiology*. 1954;123(3):451-81.
9. Vogt M. The role of the adrenal gland in homeostasis. *Quarterly journal of experimental physiology and cognate medical sciences*. 1954;39(4):245-52.
10. Grote C. *In vivo Untersuchungen der Wirkung von Neurotoxinen auf das nigrostriatale System der Ratte [Dissertation]*. Marburg (Lahn): Philipps-Universitaet; 1994.
11. Olson JM. *Clinical Pharmacology made ridiculously simple*: MedMaster; 2001.
12. Heyrovskya J. The processes at the mercury dropping cathode. Part II. The hydrogen overpotential. *Trans Faraday Soc*. 1924;19(March):785-8.
13. Stamford JA. *In vivo voltammetry: promise and perspective*. *Brain research*. 1985;357(2):119-35.
14. Finlay J, Zigmond M. *A critical analysis of neurochemical methods for monitoring transmitter dynamics in the brain*. *Psychopharmacology: the Fourth Generation of Progress* New York: Raven Press Ltd. 1995:29-40.
15. Kawagoe KT, Zimmerman JB, Wightman RM. Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *Journal of neuroscience methods*. 1993;48(3):225-40.
16. Nussbaum MA, Przedwiecki JE, Staerk DU, Lunte SM, Riley CM. Electrochemical characteristics of amino acids and peptides derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde: pH effects and differences in oxidation potentials. *Analytical chemistry*. 1992;64(11):1259-63.
17. Hochstetler SE, Wightman RM. *Detection of secretion with Electrochemical Methods*. *On-Line Biophysics Textbook*. 1998.

18. Ozel RE, Wallace KN, Andreescu S. Chitosan coated carbon fiber microelectrode for selective in vivo detection of neurotransmitters in live zebrafish embryos. *Analytica chimica acta*. 2011;695(1-2):89-95.
19. Cespuglio R, Faradji H, Ponchon JL, Buda M, Riou F, Gonon F, et al. Differential pulse voltammetry in brain tissue. I. Detection of 5-hydroxyindoles in the rat striatum. *Brain research*. 1981;223(2):287-98.
20. Robinson DL, Venton BJ, Heien ML, Wightman RM. Detecting subsecond dopamine release with fast-scan cyclic voltammetry in vivo. *Clinical chemistry*. 2003;49(10):1763-73.
21. Crespi F. Influence of Neuropeptide Y and antidepressants upon cerebral monoamines involved in depression: an in vivo electrochemical study. *Brain research*. 2011;1407:27-37.
22. Samaranayake S, Abdalla A, Robke R, Wood KM, Zeqja A, Hashemi P. In vivo histamine voltammetry in the mouse preammillary nucleus. *The Analyst*. 2015;140(11):3759-65.
23. Dankoski EC, Agster KL, Fox ME, Moy SS, Wightman RM. Facilitation of serotonin signaling by SSRIs is attenuated by social isolation. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2014;39(13):2928-37.
24. Morales-Medina JC, Dumont Y, Benoit CE, Bastianetto S, Flores G, Fournier A, et al. Role of neuropeptide Y Y(1) and Y(2) receptors on behavioral despair in a rat model of depression with comorbid anxiety. *Neuropharmacology*. 2012;62(1):200-8.
25. Scholz F. *Electroanalytical methods*: Springer; 2010.
26. Suaud-Chagny MF, Mermet C, Gonon F. Electrically evoked noradrenaline release in the rat hypothalamic paraventricular nucleus studied by in vivo electrochemistry: characterization and facilitation by increasing the stimulation frequency. *Neuroscience*. 1990;34(2):411-22.
27. Gonon F, Buda M, Cespuglio R, Jouvét M, Pujol JF. In vivo electrochemical detection of catechols in the neostriatum of anaesthetized rats: dopamine or DOPAC? *Nature*. 1980;286(5776):902-4.
28. Clement HW, Schafer F, Ruwe C, Gemsa D, Wesemann W. Stress-induced changes of extracellular 5-hydroxyindoleacetic acid concentrations followed in the nucleus raphe dorsalis and the frontal cortex of the rat. *Brain research*. 1993;614(1-2):117-24.
29. Pihel K, Hsieh S, Jorgenson JW, Wightman RM. Electrochemical detection of histamine and 5-hydroxytryptamine at isolated mast cells. *Analytical chemistry*. 1995;67(24):4514-21.
30. Kennedy RT, Huang L, Atkinson MA, Dush P. Amperometric monitoring of chemical secretions from individual pancreatic beta-cells. *Analytical chemistry*. 1993;65(14):1882-7.
31. Theodoridis I, Lambrou GI. Voltammetry and monoamines determination: an old acquaintance revisited. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2019;24:231-44.
32. Budai D, Hernádi I, Mészáros B, Bali ZK, Gulya K. Electrochemical responses of carbon fiber microelectrodes to dopamine in vitro and in vivo. *Acta Biologica Szegediensis*. 2010;54(2):155-60.
33. Adams KL, Puchades M, Ewing AG. In Vitro Electrochemistry of Biological Systems. *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif)*. 2008;1:329.
34. Hashemi P, Dankoski EC, Petrovic J, Keithley RB, Wightman RM. Voltammetric detection of 5-hydroxytryptamine release in the rat brain. *Analytical chemistry*. 2009;81(22):9462-71.

35. Bath BD, Michael DJ, Trafton BJ, Joseph JD, Runnels PL, Wightman RM. Subsecond adsorption and desorption of dopamine at carbon-fiber microelectrodes. *Analytical chemistry*. 2000;72(24):5994-6002.
36. Broderick PA. State-of-the-art microelectrodes for in vivo voltammetry. *Electroanalysis*. 1990;2(3):241-51.
37. Leszczyszyn DJ, Jankowski JA, Viveros OH, Diliberto EJ, Jr., Near JA, Wightman RM. Secretion of catecholamines from individual adrenal medullary chromaffin cells. *Journal of neurochemistry*. 1991;56(6):1855-63.
38. Gonzalez-Mora JL, Guadalupe T, Fumero B, Mas M. Mathematical resolution of mixed in vivo voltammetry signals. Models, equipment, assessment by simultaneous microdialysis sampling. *Journal of neuroscience methods*. 1991;39(3):231-44.
39. Clement HW, Buschmann J, Rex S, Grote C, Opper C, Gemsa D, et al. Effects of interferon-gamma, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor-alpha on the serotonin metabolism in the nucleus raphe dorsalis of the rat. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*. 1997;104(10):981-91.
40. Millar J, Williams GV. Fast Differential Ramp Voltammetry - a New Voltammetric Technique Designed Specifically for Use in Neuronal Tissue. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1990;282(1-2):33-49.
41. Marcenac F, Gonon F. Fast in vivo monitoring of dopamine release in the rat brain with differential pulse amperometry. *Analytical chemistry*. 1985;57(8):1778-9.
42. Wightman RM, Brown DS, Kuhr WG, Wilson RL. Molecular specificity of in vivo electrochemical measurements. *Voltammetry in the Neurosciences*: Springer; 1987. p. 103-38.
43. Marsden CA, Joseph MH, Kruk ZL, Maidment NT, O'Neill RD, Schenk JO, et al. In vivo voltammetry--present electrodes and methods. *Neuroscience*. 1988;25(2):389-400.
44. Whitson PE, VandenBorn H, Evans DH. Acquisition and analysis of cyclic voltammetric data. *Analytical chemistry*. 1973;45(8):1298-306.
45. Chen RS, Huang WH, Tong H, Wang ZL, Cheng JK. Carbon fiber nanoelectrodes modified by single-walled carbon nanotubes. *Analytical chemistry*. 2003;75(22):6341-5.
46. Park J, Show Y, Quaiserova V, Galligan JJ, Fink GD, Swain GM. Diamond microelectrodes for use in biological environments. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2005;583(1):56-68.
47. Falat L, Cheng HY. Voltammetric Differentiation of Ascorbic-Acid and Dopamine at an Electrochemically Treated Graphite Epoxy Electrode. *Analytical chemistry*. 1982;54(12):2108-11.
48. Nagy G, Rice ME, Adams RN. A new type of enzyme electrode: the ascorbic acid eliminator electrode. *Life sciences*. 1982;31(23):2611-6.
49. Heien ML, Phillips PE, Stuber GD, Seipel AT, Wightman RM. Overoxidation of carbon-fiber microelectrodes enhances dopamine adsorption and increases sensitivity. *The Analyst*. 2003;128(12):1413-9.
50. Hermans A, Seipel AT, Miller CE, Wightman RM. Carbon-fiber microelectrodes modified with 4-sulfobenzene have increased sensitivity and selectivity for catecholamines. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2006;22(5):1964-9.
51. O. S, F. T, M. O-P, A. D. Electrochemical behaviour of selected β -amino alcohols and amino acids. *Austin J Anal Pharm Chem*. 2015;2(3):1-7.

52. May LJ, Wightman RM. Heterogeneity of stimulated dopamine overflow within rat striatum as observed with in vivo voltammetry. *Brain research*. 1989;487(2):311-20.
53. Cespuaglio R, Faradji H, Hahn Z, Jouvet M. Measurement of Neurotransmitter Release in vivo. In: Marsden C, editor. Chichester: Wiley; 1984. p. 173-91.
54. Cespuaglio R, Sarda N, Gharib A, Chastrette N, Houdouin F, Rampin C, et al. Voltammetric detection of the release of 5-hydroxyindole compounds throughout the sleep-waking cycle of the rat. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung*. 1990;80(1):121-8.
55. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press; 1982.
56. Grote C, Clement HW, Wesemann W. In: Lehnert H, Murison R, Weiner H, Hellhammer D, Beyer J, editors. *Endocrine and Nutritional Control of Basic Biological Functions*. Toronto: Hogrefe and Huber; 1993. p. 71-5.
57. Wesemann W, Blaschke S, Solbach M, Grote C, Clement HW, Riederer P. Intranigral injected iron progressively reduces striatal dopamine metabolism. *Journal of neural transmission*. 1994;8(3):209-14.
58. Wesemann W, Grote C, Clement HW, Block F, Sontag KH. Functional studies on monoaminergic transmitter release in parkinsonism. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 1993;17(3):487-99.
59. Haykin SS, Haykin SS, Haykin SS, Haykin SS. *Neural networks and learning machines*: Pearson Education Upper Saddle River; 2009.
60. Theodoridis S, Koutroumbas K. *Pattern recognition and neural networks*. Machine Learning and Its Applications: Springer; 2001. p. 169-95.
61. Lloyd SP. Least-Squares Quantization in Pcm. *Ieee Transactions on Information Theory*. 1982;28(2):129-37.
62. Ball GH, Hall DJ. A clustering technique for summarizing multivariate data. *Behav Sci*. 1967;12(2):153-5.
63. MacQueen J, editor *Some methods for classification and analysis of multivariate observations*. Proceedings of the fifth Berkeley symposium on mathematical statistics and probability; 1967: Oakland, CA, USA.
64. Mahajan M, Nimbhorkar P, Varadarajan K. The Planar k-Means Problem is NP-Hard. In: Das S, Uehara R, editors. *WALCOM: Algorithms and Computation: Third International Workshop, WALCOM 2009, Kolkata, India, February 18-20, 2009 Proceedings*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 274-85.
65. Arthur D, Vassilvitskii S. k-means++: the advantages of careful seeding. Proceedings of the eighteenth annual ACM-SIAM symposium on Discrete algorithms; New Orleans, Louisiana. 1283494: Society for Industrial and Applied Mathematics; 2007. p. 1027-35.
66. Pham DT, Dimov SS, Nguyen CD. Selection of K in K-means clustering. *P I Mech Eng C-J Mec*. 2005;219(1):103-19.
67. Li J, Kennedy GF, Gundry L, Bond AM, Zhang J. Application of Bayesian Inference in Fourier Transformed Alternating Current Voltammetry for Electrode Kinetic Mechanism Distinction. *Analytical chemistry*. 2019.

68. Song MJ, Kim S, Ki Min N, Jin JH. Electrochemical serotonin monitoring of poly(ethylenedioxythiophene):poly(sodium 4-styrenesulfonate)-modified fluorine-doped tin oxide by predeposition of self-assembled 4-pyridylporphyrin. *Biosensors & bioelectronics*. 2014;52:411-6.
69. Mofidi Z, Norouzi P, Sajadian M, Ganjali MR. Simultaneous extraction and determination of trace amounts of diclofenac from whole blood using supported liquid membrane microextraction and fast Fourier transform voltammetry. *Journal of separation science*. 2018;41(7):1644-50.
70. Adamson H, Bond AM, Parkin A. Probing biological redox chemistry with large amplitude Fourier transformed ac voltammetry. *Chemical communications (Cambridge, England)*. 2017;53(69):9519-33.
71. Doroodmand MM. Discrete Fourier Transform as applicable technique in electrochemical detection of hydrazine using multi-walled carbon nanotube/polyacrylonitrile ceramic fiber as working electrode. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2013;33(4):1969-74.
72. Norouzi P, Gupta VK, Larijani B, Rasoolipour S, Faridbod F, Ganjali MR. Coulometric differential FFT admittance voltammetry determination of Amlodipine in pharmaceutical formulation by nano-composite electrode. *Talanta*. 2015;131:577-84.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

12 ΚΩΔΙΚΑΣ MATLAB

Η ενότητα αυτή περιλαμβάνει τον κώδικα που χρησιμοποιήθηκε για την υλοποίηση των παραπάνω αναλύσεων.

12.1. Μετασχηματισμοί Fourier

```
clc;
clear all;
load 'measures.mat';

dtft_abs=zeros(90,2000)
dtft_angle=zeros(90,2000)
dft_abs=zeros(90,11100)
dft_angle=zeros(90,11100)

for d=1:9
    string1=strcat('MEXV00',int2str(d));
    [Xw,Xk]=procl(eval(string1),string1);
    l=length(Xw);
    l1=length(Xk);
    dtft_abs(d,1:l)=abs(Xw);
    dtft_angle(d,1:l)=angle(Xw);
    dft_abs(d,1:l1)=abs(Xk);
    dft_angle(d,1:l1)=angle(Xk);
end

for d=10:13
    string1=strcat('MEXV0',int2str(d));
    [Xw,Xk]=procl(eval(string1),string1);
    l=length(Xw);
    l1=length(Xk);
    dtft_abs(d,1:l)=abs(Xw);
    dtft_angle(d,1:l)=angle(Xw);
    dft_abs(d,1:l1)=abs(Xk);
    dft_angle(d,1:l1)=angle(Xk);
end

for d=1:9
    d1=d+13;
    string1=strcat('MIVR00',int2str(d));
    [Xw,Xk]=procl(eval(string1),string1);
    l=length(Xw);
    l1=length(Xk);
    dtft_abs(d1,1:l)=abs(Xw);
    dtft_angle(d1,1:l)=angle(Xw);
    dft_abs(d1,1:l1)=abs(Xk);
    dft_angle(d1,1:l1)=angle(Xk);
end

for d=10:71
    d1=d+13;
    string1=strcat('MIVR0',int2str(d));
    try
    [Xw,Xk]=procl(eval(string1),string1);
    l=length(Xw);
    l1=length(Xk);
    dtft_abs(d1,1:l)=abs(Xw);
    dtft_angle(d1,1:l)=angle(Xw);
    dft_abs(d1,1:l1)=abs(Xk);
```

```

    dft_angle(d1,1:l1)=angle(Xk);
    catch
    end
end

for d=1:6
    d2=d+84;
    string1=strcat('MIVV00',int2str(d));
    [Xw,Xk]=procl(eval(string1),string1);
    l=length(Xw);
    l1=length(Xk);
    dtft_abs(d2,1:l)=abs(Xw);
    dtft_angle(d2,1:l)=angle(Xw);
    dft_abs(d2,1:l1)=abs(Xk);
    dft_angle(d2,1:l1)=angle(Xk);
end

```

12.1.1. Υλοποίηση γραφικών παραστάσεων και κλήση συναρτήσεων για τους M/Σ Fourier

```

function [X1,Xk] = procl(x ,name)

t = [0:6:6*[length(x)-1]];

found=0;
i=3;
% while (i<=220 & found==0)
%     r = int2str(i);
%     row = strcat('A',r);
%     column1 = strcat('C',r);
%     column2 = strcat('D',r);
%     column3 = strcat('O',r);
%     column4 = strcat('R',r);
%     [n1,n2] = xlsread('metriseis.xlsx', 2, row);
%     n2=string(n2);
%     if (n2==name)
%         found=1;
%         [ee,type] = xlsread('metriseis.xlsx' , 2, column1);
%         [pp,ex] = xlsread('metriseis.xlsx' , 2, column3);
%         ex=string(ex);
%         type=string(type);
%         if ex=='IN VITRO'
%             [ss,substance] = xlsread('metriseis.xlsx' , 2, column2);
%             substance=string(substance);
%             heading=strcat(ex,'-',substance,'-',type);
%         else
%             [ff,fluid] = xlsread('metriseis.xlsx' , 2, column4);
%             fluid=string(fluid);
%             heading=strcat(ex,'-', 'body fluid:',fluid);
%         end
%     else
%         i=i+1;
%     end
% end
%
% plot(t,x)
% grid on;
% xlabel('time (s)');
% ylabel('signal (mV)');
% heading2=strcat(n2,':',heading);
% title(heading2);

```

```

% n3=strcat('xn_',name);
% saveas(gcf,n3,'fig')
% saveas(gcf,n3,'jpg')
% close all force
% xlog= logarithm(x, t, heading2, name);

[X1, rf]= MSF(x, name);

Xk = dft(x, name);

end

```

12.1.2. Μετασχηματισμός DTFT

```

function [ XX, w1 ] = MSF( x, name2 )

[X,w]=dtft(x);
w1=-3*pi:0.01:3*pi;
XX=subs(X,w,w1);
% figure(3);
% h = strcat('DTFT','(',head,')');
% plot(w1,abs(XX))
% grid on;
% xlabel('w (rad/s)');
% ylabel('|X(w)|');
% title(h);
% n5=strcat('dtft_abs(X)_',name2);
% saveas(gcf,n5,'fig')
% saveas(gcf,n5,'jpg')
%
% figure(2);
% plot(w1,angle(XX))
% grid on;
% xlabel('w (rad/s)');
% ylabel('<X(w)');
% title(h);
% n6=strcat('dtft_angle(X)_',name2);
% saveas(gcf,n6,'fig')
% saveas(gcf,n6,'jpg')
%
% close all force

end

```

12.1.3. Μετασχηματισμός DFT

```

function [ Xk ] = dft( x, name2 )

n1=0:1:length(x)-1;
Xk = fft(x);
% stem(n1,abs(Xk))
% grid on;
% xlabel('n');
% ylabel('|Xk|');
% h1=strcat('DFT','(',head1,')');
% title(h1);
% n7=strcat('dft_abs(Xk)_',name2);
% saveas(gcf,n7,'fig')
% saveas(gcf,n7,'jpg')
%
% figure(2);
% stem(n1,angle(Xk))
% grid on;

```

```

% xlabel('n');
% ylabel('<Xk');
% title(h1);
% n8=strcat('dft_angle(Xk)_',name2);
% saveas(gcf,n8,'fig')
% saveas(gcf,n8,'jpg')

```

```
close all force
```

```
end
```

12.2. K-Means των Μετασχηματισμών Fourier

```
%% 14.1. K-MEANS CLUSTERING (NATURALS)
```

```
clear all;
load raw_data.mat
clc;
close all force;
```

```
import bioma.data.*
```

```
dft_abs_Datamatrix=DataMatrix(dft_abs,'RowNames',substances,'ColNames',time_dft_abs);
dft_angle_Datamatrix=DataMatrix(dft_angle,'RowNames',substances,'ColNames',time_dft_angle);
```

```
dtft_abs_Datamatrix=DataMatrix(dtft_abs,'RowNames',substances,'ColNames',time_dtft_abs);
dtft_angle_Datamatrix=DataMatrix(dtft_angle,'RowNames',substances,'ColNames',time_dtft_angle);
```

```
%% DFT ABS
% Define Max number of Clusters
maxclust_kmeans14_1_1=16;
close all force;
```

```
% Compute k-means Clusters
```

```
% create a DataMatrix with the mean values and variables from the
% descriptive statistics
Map_Naturals=dft_abs_Datamatrix;
map_quantile_naturals_significant=Map_Naturals;
```

```
[index_rat14_1_1, centroids_rat14_1_1, sumd1_rat14_1_1, D_rat14_1_1] =
kmeans(map_quantile_naturals_significant, maxclust_kmeans14_1_1,...
        'distance','sqEuclidean',...
        'emptyaction','singleton',...
        'replicates',100,...
        'start','sample',...
        'disp','final');
```

```
% Plot k-means Clusters of all samples
```

```
figure;
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_1
    subplot(sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),c);
    plot(map_quantile_naturals_significant((index_rat14_1_1==c),:));
    set(gca,'XTickLabel',map_quantile_naturals_significant.colnames);
    set(gca,'FontName','Times New Roman');
    set(gca,'FontSize',7);
    axis tight;
    axis on;
end
```

```

end
suptitle('DFT ABS: Clusters');
ind=ind+1;saveas(gcf, strcat(fig_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.fig'));
saveas(gcf, strcat(image_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.tif'));

% Extract Standard Deviations for Centroids from Each k-means cluster
[rows14_1_1,cols14_1_1]=size(Map_Naturals);
kmeans_cluster_rat2=zeros(rows14_1_1,cols14_1_1);
std_rat1=zeros(maxclust_kmeans14_1_1,cols14_1_1);
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_1

kmeans_cluster_rat2=(map_quantile_naturals_significant((index_rat14_1_1==c),:));
    transposed_kmeans_cluster_rat1=transpose(kmeans_cluster_rat2);
    kmeans_std_rat1=std(transposed_kmeans_cluster_rat1);
    std_rat1(c,:)=kmeans_std_rat1;
    [rows_kmeans_rat1,
cols_kmeans_rat1]=size(transposed_kmeans_cluster_rat1);
    kmeans_cluster_rat2=transposed_kmeans_cluster_rat1.(':'),(':');

xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dft_abs.xlsx'),transposed_kmeans_cluster_rat1.rownames,strcat('dft_abs', num2str(c)), 'A2');

xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dft_abs.xlsx'),transposed_kmeans_cluster_rat1.colnames,strcat('dft_abs', num2str(c)), 'B1');

xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dft_abs.xlsx'),transposed_kmeans_cluster_rat1.(':'),(':'),strcat('dft_abs', num2str(c)), 'B2');
end;

% Plot Centroids of k-means with Standard Deviations
figure;
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_1
    subplot(sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),c);
    plot(centroids_rat14_1_1(c,:));
    errorbar(centroids_rat14_1_1(c,:),std_rat1(c,:));
    set(gca,'XTickLabel',map_quantile_naturals_significant.colnames);
    set(gca,'FontName','Times New Roman');
    set(gca,'FontSize',7);
    axis tight;
    axis on;
end;
suptitle('DFT ABS: Centroids');
ind=ind+1;saveas(gcf, strcat(fig_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.fig'));
saveas(gcf, strcat(image_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.tif'));

% Plot Sorted Centroids of k-means with Standard Deviations
figure('Visible','on');
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_1
    subplot(sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),c);

map_centroids_std14_1_1=DataMatrix([centroids_rat14_1_1(c,:);std_rat1(c,:)]
,'ColNames',transposed_kmeans_cluster_rat1.colnames);
map_centroids_std14_1_1=sortcols(map_centroids_std14_1_1,1);
plot(map_centroids_std14_1_1(1,:));
x=map_centroids_std14_1_1(1,:); x=x.(':'),(':');
y=map_centroids_std14_1_1(2,:); y=y.(':'),(':');
errorbar(x',y);
set(gca,'XTickLabel',map_centroids_std14_1_1.colnames);

set(gca,'FontName','Times New Roman');
set(gca,'FontSize',5);
axis tight;

```

```

axis on;

xlswrite(strcat(export_path, '\', 'kmeans_dft_abs.xlsx'), map_centroids_std14_1_1.colnames, strcat('dft_abs_centroids_sorted_', num2str(c)), 'B1');

xlswrite(strcat(export_path, '\', 'kmeans_dft_abs.xlsx'), map_centroids_std14_1_1.(:) (:), strcat('dft_abs_centroids_sorted_', num2str(c)), 'B2');
end;
suptitle('DFT ABS: Sorted Centroids');
ind=ind+1;
saveas(gcf, strcat(fig_path, '\', 'Figure_', num2str(ind), '.fig'));
export_fig(strcat(image_path, '\', 'Figure_', num2str(ind), '.tif'), '-nocrop', '-r300');

%% DFT ANGLE
% Define Max number of Clusters
maxclust_kmeans14_1_1=16;
close all force;

% Compute k-means Clusters

% create a DataMatrix with the mean values and variables from the
% descriptive statistics
Map_Naturals=dft_angle_Datamatrix;
map_quantile_naturals_significant=Map_Naturals;

[index_rat14_1_2, centroids_rat14_1_1, sumd1_rat14_1_1, D_rat14_1_1] =
kmeans(map_quantile_naturals_significant, maxclust_kmeans14_1_1, ...
        'distance', 'sqEuclidean', ...
        'emptyaction', 'singleton', ...
        'replicates', 100, ...
        'start', 'sample', ...
        'disp', 'final');

% Plot k-means Clusters of all samples
figure;
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_1
    subplot(sqrt(maxclust_kmeans14_1_1), sqrt(maxclust_kmeans14_1_1), c);
    plot(map_quantile_naturals_significant((index_rat14_1_2==c), :));
    set(gca, 'XTickLabel', map_quantile_naturals_significant.colnames);
    set(gca, 'FontName', 'Times New Roman');
    set(gca, 'FontSize', 7);
    axis tight;
    axis on;
end
suptitle('DFT ANGLE: Clusters');
ind=ind+1; saveas(gcf, strcat(fig_path, '\', 'Figure_', num2str(ind), '.fig'));
saveas(gcf, strcat(image_path, '\', 'Figure_', num2str(ind), '.tif'));

% Extract Standard Deviations for Centroids from Each k-means cluster
[rows14_1_1, cols14_1_1]=size(Map_Naturals);
kmeans_cluster_rat2=zeros(rows14_1_1, cols14_1_1);
std_rat1=zeros(maxclust_kmeans14_1_1, cols14_1_1);
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_1

kmeans_cluster_rat2=(map_quantile_naturals_significant((index_rat14_1_2==c), :));
    transposed_kmeans_cluster_rat1=transpose(kmeans_cluster_rat2);
    kmeans_std_rat1=std(transposed_kmeans_cluster_rat1);
    std_rat1(c, :)=kmeans_std_rat1;

```

```

    [rows_kmeans_rat1,
    cols_kmeans_rat1]=size(transposed_kmeans_cluster_rat1);
    kmeans_cluster_rat2=transposed_kmeans_cluster_rat1.(':')(':');

    xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dft_angle.xlsx'),transposed_kmeans_
    cluster_rat1.rownames,strcat('dft_angle', num2str(c),'A2'));

    xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dft_angle.xlsx'),transposed_kmeans_
    cluster_rat1.colnames,strcat('dft_angle', num2str(c),'B1'));

    xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dft_angle.xlsx'),transposed_kmeans_
    cluster_rat1.(':')(':'),strcat('dft_angle', num2str(c),'B2'));
end;

% Plot Centroids of k-means with Standard Deviations
figure;
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_1
    subplot(sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),c);
    plot(centroids_rat14_1_1(c,:));
    errorbar(centroids_rat14_1_1(c,:),std_rat1(c,:));
    set(gca,'XTickLabel',map_quantile_naturals_significant.colnames);
    set(gca,'FontName','Times New Roman');
    set(gca,'FontSize',7);
    axis tight;
    axis on;
end;
suptitle('DFT ANGLE: Centroids');
ind=ind+1;saveas(gcf,strcat(fig_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.fig'));
saveas(gcf,strcat(image_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.tif'));

% Plot Sorted Centroids of k-means with Standard Deviations
figure('Visible','on');
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_1
    subplot(sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),c);

    map_centroids_std14_1_1=DataMatrix([centroids_rat14_1_1(c,:);std_rat1(c,:)])
    , 'ColNames',transposed_kmeans_cluster_rat1.colnames);
    map_centroids_std14_1_1=sortcols(map_centroids_std14_1_1,1);
    plot(map_centroids_std14_1_1(1,:));
    x=map_centroids_std14_1_1(1,:); x=x.(':')(':');
    y=map_centroids_std14_1_1(2,:); y=y.(':')(':');
    errorbar(x',y);
    set(gca,'XTickLabel',map_centroids_std14_1_1.colnames);

    set(gca,'FontName','Times New Roman');
    set(gca,'FontSize',5);
    axis tight;
    axis on;

    xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dft_angle.xlsx'),map_centroids_std1
    4_1_1.colnames,strcat('dft_angle_centroids_sorted_', num2str(c),'B1'));

    xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dft_angle.xlsx'),map_centroids_std1
    4_1_1.(':')(':'),strcat('dft_angle_centroids_sorted_', num2str(c),'B2'));
end;
suptitle('DFT ANGLE: Sorted Centroids');
ind=ind+1;
saveas(gcf,strcat(fig_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.fig'));
export_fig (strcat(image_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.tif'),'-
nocrop','-r300');

% DTFT ABS

```



```

% Define Max number of Clusters
maxclust_kmeans14_1_1=25;
close all force;

% Compute k-means Clusters

% create a DataMatrix with the mean values and variables from the
% descriptive statistics
Map_Naturals=dtft_abs_Datamatrix;
map_quantile_naturals_significant=Map_Naturals;

[index_rat14_1_1, centroids_rat14_1_1, sumdl_rat14_1_1, D_rat14_1_1] =
kmeans(map_quantile_naturals_significant, maxclust_kmeans14_1_1,...
        'distance','sqEuclidean',...
        'emptyaction','singleton',...
        'replicates',100,...
        'start','sample',...
        'disp','final');

% Plot k-means Clusters of all samples
figure;
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_1
    subplot(sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),c);
    plot (map_quantile_naturals_significant((index_rat14_1_1==c),:));
    set(gca,'XTickLabel',map_quantile_naturals_significant.colnames);
    set(gca,'FontName','Times New Roman');
    set(gca,'FontSize',7);
    axis tight;
    axis on;
end
suptitle('DTFT ABS: Clusters');
ind=ind+1;saveas(gcf, strcat(fig_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.fig'));
saveas(gcf, strcat(image_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.tif'));

% Extract Standard Deviations for Centroids from Each k-means cluster
[rows14_1_1,cols14_1_1]=size(Map_Naturals);
kmeans_cluster_rat2=zeros(rows14_1_1,cols14_1_1);
std_rat1=zeros(maxclust_kmeans14_1_1,cols14_1_1);
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_1

kmeans_cluster_rat2=(map_quantile_naturals_significant((index_rat14_1_1==c)
,:));
    transposed_kmeans_cluster_rat1=transpose(kmeans_cluster_rat2);
    kmeans_std_rat1=std(transposed_kmeans_cluster_rat1);
    std_rat1(c,:)=kmeans_std_rat1;
    [rows_kmeans_rat1,
cols_kmeans_rat1]=size(transposed_kmeans_cluster_rat1);
    kmeans_cluster_rat2=transposed_kmeans_cluster_rat1.(':'),(':');

xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dtft_abs.xlsx'),transposed_kmeans_c
luster_rat1.rownames,strcat('dtft_abs', num2str(c),'A2'));

xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dtft_abs.xlsx'),transposed_kmeans_c
luster_rat1.colnames,strcat('dtft_abs', num2str(c),'B1'));

xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dtft_abs.xlsx'),transposed_kmeans_c
luster_rat1.(':'),(':'),strcat('dtft_abs', num2str(c),'B2'));
end;

% Plot Centroids of k-means with Standard Deviations
figure;
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_1
    subplot(sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),c);

```

```

    plot(centroids_rat14_1_1(c,:));
    errorbar(centroids_rat14_1_1(c,:),std_rat1(c,:));
    set(gca,'XTickLabel',map_quantile_naturals_significant.colnames);
    set(gca,'FontName','Times New Roman');
    set(gca,'FontSize',7);
    axis tight;
    axis on;
end;
suptitle('DTFT ABS: Centroids');
ind=ind+1;saveas(gcf, strcat(fig_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.fig'));
saveas(gcf, strcat(image_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.tif'));

% Plot Sorted Centroids of k-means with Standard Deviations
figure('Visible','on');
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_1
    subplot(sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),sqrt(maxclust_kmeans14_1_1),c);

map_centroids_std14_1_1=DataMatrix([centroids_rat14_1_1(c,:);std_rat1(c,:)],
'ColNames',transposed_kmeans_cluster_rat1.colnames);
map_centroids_std14_1_1=sortcols(map_centroids_std14_1_1,1);
plot(map_centroids_std14_1_1(1,:));
x=map_centroids_std14_1_1(1,:); x=x.(':'),(':');
y=map_centroids_std14_1_1(2,:); y=y.(':'),(':');
errorbar(x',y');
set(gca,'XTickLabel',map_centroids_std14_1_1.colnames);

    set(gca,'FontName','Times New Roman');
    set(gca,'FontSize',5);
    axis tight;
    axis on;

xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dtft_abs.xlsx'),map_centroids_std14_1_1.colnames,
strcat('dtft_abs_centroids_sorted_', num2str(c)), 'B1');

xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dtft_abs.xlsx'),map_centroids_std14_1_1.(':'),(':'),
strcat('dtft_abs_centroids_sorted_', num2str(c)), 'B2');
end;
suptitle('DTFT ABS: Sorted Centroids');
ind=ind+1;
saveas(gcf, strcat(fig_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.fig'));
export_fig(strcat(image_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.tif'),'-nocrop','-r300');

%% DTFT ANGLE
% Define Max number of Clusters
maxclust_kmeans14_1_4=16;
close all force;

% Compute k-means Clusters

% create a DataMatrix with the mean values and variables from the
% descriptive statistics
Map_Naturals=dtft_angle_Datamatrix;
map_quantile_naturals_significant=Map_Naturals;

[index_rat14_1_2, centroids_rat14_1_1, sumd1_rat14_1_1, D_rat14_1_1] =
kmeans(map_quantile_naturals_significant, maxclust_kmeans14_1_4,...
        'distance','sqEuclidean',...
        'emptyaction','singleton',...
        'replicates',100,...
        'start','sample',...

```

```

        'disp','final');

% Plot k-means Clusters of all samples
figure;
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_4
    subplot(sqrt(maxclust_kmeans14_1_4),sqrt(maxclust_kmeans14_1_4),c);
    plot (map_quantile_naturals_significant((index_rat14_1_2==c),:));
    set(gca,'XTickLabel',map_quantile_naturals_significant.colnames);
    set(gca,'FontName','Times New Roman');
    set(gca,'FontSize',7);
    axis tight;
    axis on;
end
suptitle('DTFT ANGLE: Clusters');
ind=ind+1;saveas (gcf, strcat(fig_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.fig'));
saveas (gcf, strcat(image_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.tif'));

% Extract Standard Deviations for Centroids from Each k-means cluster
[rows14_1_1,cols14_1_1]=size(Map_Naturals);
kmeans_cluster_rat2=zeros(rows14_1_1,cols14_1_1);
std_rat1=zeros(maxclust_kmeans14_1_4,cols14_1_1);
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_4

kmeans_cluster_rat2=(map_quantile_naturals_significant((index_rat14_1_2==c),:));
    transposed_kmeans_cluster_rat1=transpose(kmeans_cluster_rat2);
    kmeans_std_rat1=std(transposed_kmeans_cluster_rat1);
    std_rat1(c,:)=kmeans_std_rat1;
    [rows_kmeans_rat1,
cols_kmeans_rat1]=size(transposed_kmeans_cluster_rat1);
    kmeans_cluster_rat2=transposed_kmeans_cluster_rat1.(':'),(':');

xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dtft_angle.xlsx'),transposed_kmeans
_cluster_rat1.rownames,strcat('dtft_angle', num2str(c),'A2');

xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dtft_angle.xlsx'),transposed_kmeans
_cluster_rat1.colnames,strcat('dtft_angle', num2str(c),'B1');

xlswrite(strcat(export_path,'\','kmeans_dtft_angle.xlsx'),transposed_kmeans
_cluster_rat1.(':'),(':'),strcat('dtft_angle', num2str(c),'B2');
end;

% Plot Centroids of k-means with Standard Deviations
figure;
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_4
    subplot(sqrt(maxclust_kmeans14_1_4),sqrt(maxclust_kmeans14_1_4),c);
    plot(centroids_rat14_1_1(c,:));
    errorbar(centroids_rat14_1_1(c,:),std_rat1(c,:));
    set(gca,'XTickLabel',map_quantile_naturals_significant.colnames);
    set(gca,'FontName','Times New Roman');
    set(gca,'FontSize',7);
    axis tight;
    axis on;
end;
suptitle('DTFT ANGLE: Centroids');
ind=ind+1;saveas (gcf, strcat(fig_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.fig'));
saveas (gcf, strcat(image_path,'\','Figure_',num2str(ind),'.tif'));

% Plot Sorted Centroids of k-means with Standard Deviations
figure('Visible','on');
for c = 1 : maxclust_kmeans14_1_4
    subplot(sqrt(maxclust_kmeans14_1_4),sqrt(maxclust_kmeans14_1_4),c);

```

```

map_centroids_std14_1_1=DataMatrix([centroids_rat14_1_1(c,:);std_rat1(c,:)]
, 'ColNames',transposed_kmeans_cluster_rat1.colnames);
map_centroids_std14_1_1=sortcols(map_centroids_std14_1_1,1);
plot(map_centroids_std14_1_1(1,:));
x=map_centroids_std14_1_1(1,:); x=x.(:) (:);
y=map_centroids_std14_1_1(2,:); y=y.(:) (:);
errorbar(x',y);
set(gca, 'XTickLabel',map_centroids_std14_1_1.colnames);

set(gca, 'FontName', 'Times New Roman');
set(gca, 'FontSize',5);
axis tight;
axis on;

xlswrite(strcat(export_path, '\', 'kmeans_dtft_angle.xlsx'),map_centroids_std
14_1_1.colnames,strcat('dtft_angle_centroids_sorted_', num2str(c)), 'B1');

xlswrite(strcat(export_path, '\', 'kmeans_dtft_angle.xlsx'),map_centroids_std
14_1_1.(:) (:),strcat('dtft_angle_centroids_sorted_', num2str(c)), 'B2');
end;
suptitle('DTFT ANGLE: Sorted Centroids');
ind=ind+1;
saveas(gcf, strcat(fig_path, '\', 'Figure_', num2str(ind), '.fig'));
export_fig (strcat(image_path, '\', 'Figure_', num2str(ind), '.tif'), '-
nocrop', '-r300');

```